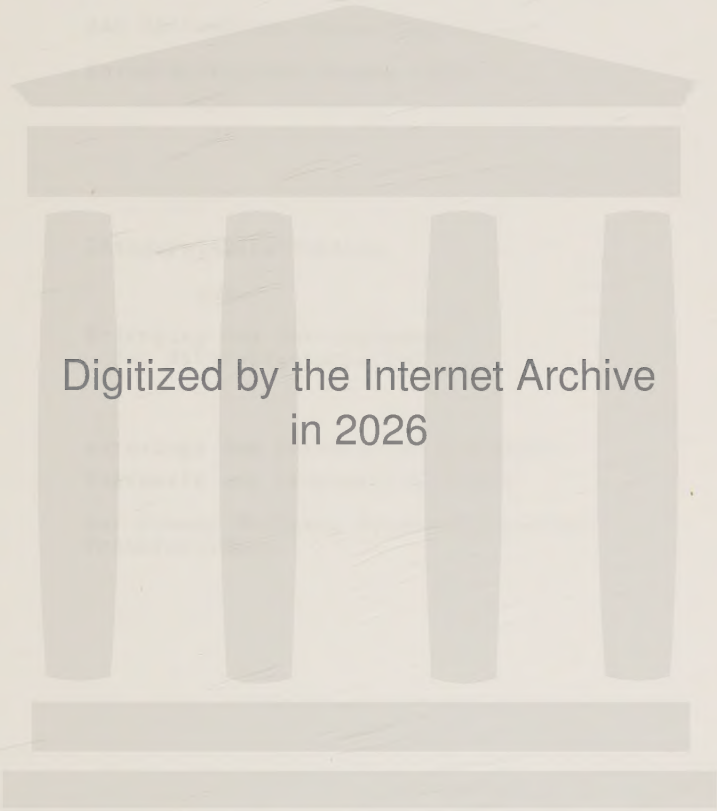
LIPIDSTOFFWECHSEL AN DER BÜRSTENSAUMMEMBRAN DER RATTENNIERE UNTER EINFLUSS VON ANTIDIURETISCHEN HORMON (ADH)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt/Main

von
JUDITH NEFF
aus Heldenbergen

Frankfurt /Main
~~1983~~
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0006

Lipidstoffwechsel an der Bürstensaummembran der Rattenniere unter Einfluß von Antidiuretischen Hormon (ADH)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie,
Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt(Main)

von
Judith Neff
aus Heldenbergen

Frankfurt/Main
1983

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof.Dr.Dr. E.Mutschler
1. Referent: Prof.Dr.Dr. H.Fasold
2. Referent: Prof.Dr. H.Oelschläger

Tag der mündlichen Prüfung: 4.4.84

Meinen lieben Eltern gewidmet

Herrn Prof. Dr. R. Kirsten möchte ich an dieser Stelle für seine Anregungen und Hinweise, sein großes Interesse, das er der vorliegenden Arbeit entgegenbrachte, sowie seine stete Hilfsbereitschaft sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold für sein Interesse und freundliches Entgegenkommen als mein Betreuer.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 5

1.1. Einführung und Problemstellung 5

2. Literaturübersicht 8

2.1. Anatomie der Niere 8
2.1.1. Die menschliche Niere 8
2.1.2. Die Rattenniere 12

2.2. Biologische Membranen 15
2.2.1. Phospholipide 15
2.2.2. Hormonrezeptoren 15

2.3. Lipidstoffwechsel 17
2.3.1. Biosynthese der Phospholipide 17
2.3.2. Enzyme des Lipidstoffwechsel 21

2.4. Antidiuretisches Hormon (ADH) 24
2.4.1. Chemische Zusammensetzung 24
2.4.2. Physiologische Aufgabe 24

3. Methoden 26

3.1. Reinigung des Rinderalbumin nach Chen 26
3.2. Bindung der 1-C^{14}-Palmitinsäure an Albumin 26
3.3. Gewinnung des Nierenhomogenates 27
3.4. Präparation der Bürstensaummembranen 27
3.5. Extinktion der Lipide nach Folch 30
3.6. Proteinbestimmung 31
3.7. Bestimmung der alkalischen Phosphatase - ein Enzym der Bürstensaummembran (EC 3.1.3.1.) 32

4. Voruntersuchungen 33

4.1. Anreicherungsversuche der Membran 33
4.2. Versuche zur Bindung der Fettsäure an Albumin 33
4.3. Radioaktiv markierte Fettsäure 37
4.4. Kurze Zusammenfassung 37

5. Chromatographische Trennmethoden der Lipide 38

5.1. Dünnschichtchromatographie 38
5.2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide und Bestimmung der radioaktiven Einbauraten 39
5.2.1. Versuchstiere 39
5.2.2. Versuchsdurchführung 39
5.2.3. Ergebnisse 43
5.2.4. Besprechung der Ergebnisse 44

5.3. Brattleboro-Ratte 46
5.3.1. Behandlung mit Antidiuretischem Hormon 47
5.3.2. Behandlungskontrolle 47

5.4. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide und Bestimmung der radioaktiven Einbauraten nach Injektion von 1-C^{14}-Palmitinsäure an Brattleboro-Ratten 50
5.4.1. Versuchsdurchführung 50
5.4.2. Ergebnisse 53
5.4.3. Besprechung der Ergebnisse 53

5.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie 56
5.5.1. Qualitative und quantitative Bestimmung der Phospholipide der Bürstensaummembran 58
5.5.2. Versuchstiere 59
5.5.3. Versuchsdurchführung 59
5.5.4. Ergebnisse 66
5.5.5. Besprechung der Ergebnisse 66

5.6. Gaschromatographie 73
5.6.1. Bestimmung, der an den Phospholipiden sitzenden Fettsäuren mittels Gaschromatographie 74
5.6.2. Versuchstiere 74
5.6.3. Versuchsdurchführung 74
5.6.4. Ergebnisse 88
5.6.5. Besprechung der Ergebnisse 88
5.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der chromatographischen Methoden 96

6. Enzyme des Lipidstoffwechsel - Bestimmung der Enzymaktivitäten 100
6.1. Versuchstiere 100
6.2. Versuchsdurchführung 101
6.3. Berechnung der spezifischen Aktivität 102
6.4. Bestimmung der Citrat Lyase (EC 4.1.3.6.) 103
6.4.1. Durchführung des Testes 103
6.4.2. Ergebnisse 104
6.4.3. Besprechung der Ergebnisse 105
6.5. Bestimmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49.) 106
6.5.1. Durchführung des Testes 107
6.5.2. Ergebnisse 107
6.5.3. Besprechung der Ergebnisse 109
6.6. Bestimmung des Malic-Enzym (EC 1.1.1.38.) 109
6.6.1. Durchführung des Testes 110
6.6.2. Ergebnisse 111
6.6.3. Besprechung der Ergebnisse 111
6.7. Zusammenfassung der enzymatischen Bestimmungen 113

7. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse 114

7.1. Diskussion 116
7.2. Zusammenfassung 122

8. Chemikalien, Apparate, Versuchstier-lieferanten 124

9. Abkürzungsverzeichnis 130

10. Literaturverzeichnis 132

11. Anhang 140

1. Einleitung

1.1. Einführung und Problemstellung

Die Niere trägt zur Konstanz des Wasserhaushaltes im Organismus bei. Die Nierenfunktion wird dabei hormonal gesteuert: Eine Zunahme der osmotischen Konzentration im Blut oder im Extrazellulärraum - registriert durch Osmorezeptoren im Hypothalamus - bewirkt eine Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) und damit eine verstärkte Wasserrückresorption. Gleichzeitig löst eine Zunahme der Osmolarität des Blutes Durstgefühl aus.
Umgekehrt wird bei einem Wasserüberschuß infolge der verminderten osmotischen Konzentration die ADH-Freisetzung gehemmt und damit die Wasserausscheidung gefördert (1).
Antidiuretisches Hormon (ADH), auch Vasopressin genannt, bewirkt die Konzentrierung des Harns durch Erhöhung der Permeabilität der harnseitigen (luminalen) Membranen gegenüber Wasser, das passiv und ohne Energieaufwand aus dem Harnkanal in das salzangereicherte Nierengewebe (Interstitium) angesaugt wird.
Trotz jahrelanger Beschäftigung sind keine Einzelheiten über die Permeabilitätsänderung der hormonempfindlichen Nierenmembranen bekannt.
Patienten mit Störung von Bildung oder Ausschüttung von ADH scheiden täglich 10 bis 20 Liter Harn aus. Die angeborene Form dieser Krankheit (Diabetes insipidus) ist selten. Häufiger kommt es zum Funktionsausfall durch Unfälle mit Beteiligung der Schädelbasis, wobei es zu Abrissen oder Abquetschungen der hormonspeichernden Hypophyse kommt.

In der vorliegenden Arbeit werden Bestimmungen durchgeführt, die zum Einen die Reproduzierbarkeit der Methoden untersuchen und, zum Anderen möglichst optimale Versuchsbedingungen schaffen sollen. Als Versuchstiere werden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet.
Im Verlauf der Arbeit wird die Wirkung des Antidiuretischen Hormons untersucht.
Die chromatographischen Untersuchungen beschäftigen sich ausschließlich mit den Lipiden der Bürstensaummembranen der Nieren von Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten.
Die Ursprungsrasse der Brattleboro-Mutante sind Ratten vom Long-Evans-Typ. Sie wurde 1961 in Brattleboro/Vermont USA entdeckt (28). Die Brattleboro-Ratten werden mit neurogenem Diabetes insipidus geboren (29).
Den Tieren wurde vor jedem Versuch 1-C^{14}-Palmitinsäure bzw. 1,4 mM Palmitinsäure, eine, zwei oder drei Stunden vor der Tötung, injiziert.
Die Dünnschichtchromatographie diente vornehmlich zur Trennung der Lipide, die dann mittels Flüssigkeitsszintographie oder Gaschromatographie weiter untersucht wurden.
Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde angewandt, um die Phospholipide zu trennen und um ihre Konzentrationen in den Bürstensaummembranen zu bestimmen.
Mit der Gaschromatographie wurde der Frage nachgegangen, ob bei Membranen im hochdurchlässigen Zustand (Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normale Ratten) die Phospholipide mehr ungesättigte Fettsäuren

enthalten als Membranen im nahezu undurchlässigen Zustand (Brattleboro-Ratten).
Außerdem interessierte bei den obengenannten Untersuchungen auch, ob ADH noch in der Rinde der Nieren wirksam ist. Der überwiegende Teil der Bürstensaummembranen ist in der Rinde der Nieren zu finden.
An die chromatographischen Untersuchungen der Membranen schließen sich Bestimmungen der Enzymaktivitäten von ATP-Citrat-Lyase, Malic-Enzym und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase an.
Die Nieren von Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten wurden für diese Untersuchungen in vier Zonen eingeteilt: Rinde, Markaußenstreifen, Markinnenstreifen und Innenzone mit Papille.
Die drei Enzyme sind eine kleine Auswahl von Enzymen die bei der Lipogenese eine wesentliche Rolle spielen. Die Bestimmung ihrer Aktivitäten soll Aufschluß darüber geben, inwieweit ADH in diesem Bereich des Lipidstoffwechsels der Niere Einfluß nimmt.

2. Literaturübersicht

2.1. Anatomie der Niere

2.1.1. Die menschliche Niere

Im Längsschnitt erkennt man die Nierenrinde, das Nierenmark und das Nierenbecken mit dem Harnleiter (Abb. 1). Die äußere Rindenschicht erscheint hell und feingekörnt, die innere Markschicht ist dunkler und weist eine feine Längsstreifung auf. Durch Säulen der Rindensubstanz wird das Mark in 8 - 16 pyramidenförmige, zum Zentrum hin konvergierende Lappen unterteilt. Deren Spitzen, die Nierenpapillen, sind von den schlauchförmigen Nierenkelchen überzogen, die den Harn auffangen und in das Nierenbecken leiten.

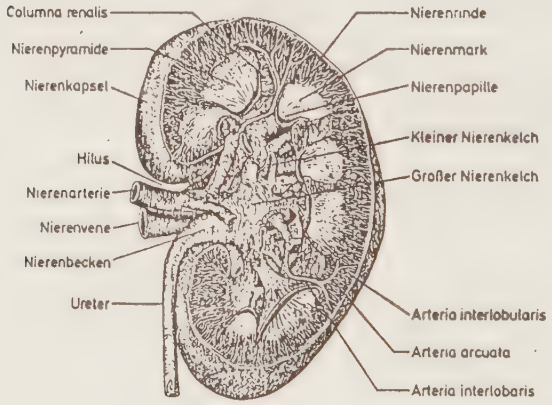


Abb. 1: Längsschnitt durch die menschliche Niere (nach H. Valtin, Funktion der Niere)

Das wichtigste Bauelement der Niere ist das Nephron (Abb. 2). Jedes Nephron besteht aus einem Nieren-

körperchen und dem Tubulusapparat. Im Nierenkörperchen wird der Primärharn gebildet und anschließend im Tubulusapparat konzentriert.

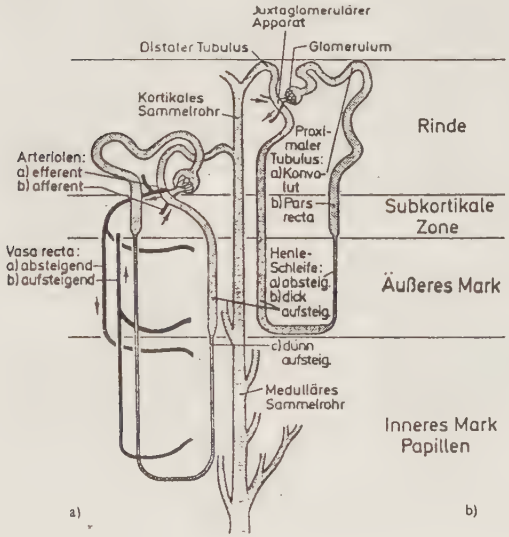


Abb. 2: Oberflächliche kortikale und juxtamedulläre Nephren und ihr Gefäßsystem
(nach H. Valtin, Funktion der Niere)

Das Nierenkörperchen (Abb. 3) setzt sich aus einem Kapillarknäul, dem Glomerulum, und der dieses umgebenden Bowmanschen Kapsel zusammen.

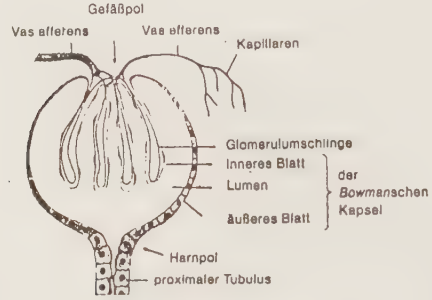


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Nierenkörperchen (aus Benninghoff-Goerttler)

Der Tubulusapparat stellt ein außerordentlich langes Röhrensystem dar, welches man in folgende Abschnitte unterteilt:

den proximalen Tubulus mit einer Pars convoluta (=contortae) und einer Pars recta,
das Überleitungsstück (dünner Teil der Henleschen Schleife),
den distalen Tubulus, wiederum mit einer Pars recta und einer Pars convoluta, sowie
das Sammelrohr.

Im proximalen Tubulus (Partes contortae et rectae), (Abb. 4), findet man die Hauptmenge an Bürstensaummembranen. Im Überleitungsstück und Mittelstück sind dagegen nur vereinzelte und deutlich kürzere Bürstensäume vorhanden (Bucher, 4).

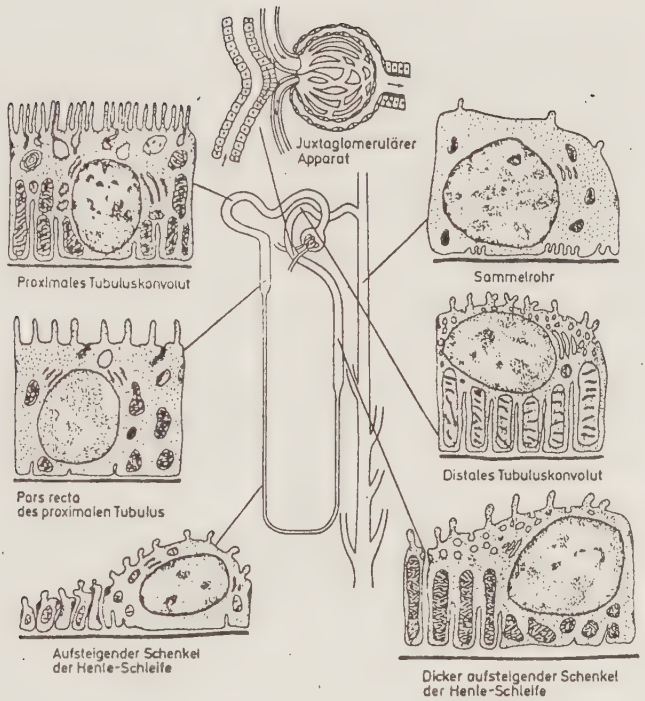


Abb. 4: Graphische Darstellung von einigen der ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den größeren Abschnitten des Nephrons (nach H. Valtin, Funktion der Niere)

2.1.2. Die Rattenniere

Die Rattenniere gliedert sich ebenso wie die menschliche Niere in Mark und Rinde. Eine Ausnahme bildet der Außenstreifen, der als subcorticale Zone anders als beim Menschen nicht dem Mark zugerechnet wird.
Die Außenzone des Marks beginnt hier mit dem Innenstreifen.
Die vier Schichten der Rattenniere sind scharf gegeneinander abgegrenzt, da die einzelnen Teile des

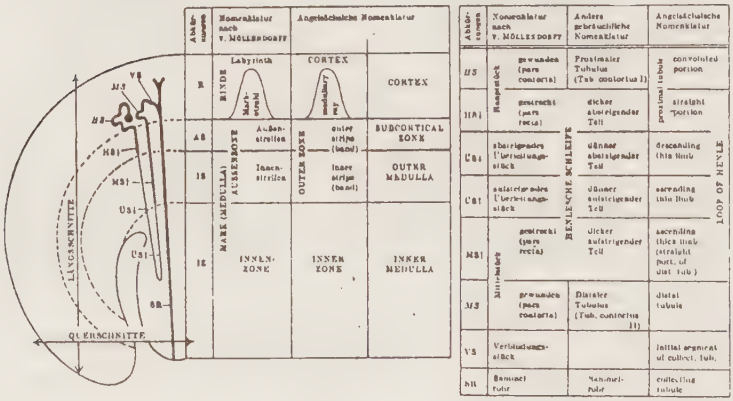


Abb. 5: Aufbau der Rattenniere nach Kriz (5)

Tubulus, Hauptstück, Überleitungsstück und Mittelstück, jeweils regelmäßig in gleichen Ebenen enden.
Die Rattenniere besitzt nur zwei Arten von Nephren, die kurzen, deren Scheitel im Innenstreifen liegen und lange Nephren mit dem Scheitel in der Innenzone. Nach SPERBER (6) sind 28% aller Nephren lange Nephren. Es fehlen die corticale Nephren.

Bei einem Körpergewicht von 200 g schwankt die Dicke der einzelnen Abschnitte um folgende Werte (5):

Rinde	1,50 ± 0,20 mm
Außenstreifen	0,65 ± 0,10 mm
Innenstreifen	1,20 ± 0,20 mm
Innenzone	3,80 ± 0,25 mm

Die Länge der Schleifen (nur gerade Teile, also gerades Hauptstück, Überleitungsstück und gerades Mittelstück) variiert bei den kurzen Schleifen zwischen 4,4 mm und 6,4 mm, bei den langen Schleifen zwischen 5,2 mm und 12,2 mm.

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schichten kurz beschrieben.

Die Nierenrinde

In der Nierenrinde unterscheidet man das Rindenlabyrinth und die Markstrahlen. Die Markstrahlen stecken zapfenartig im Labyrinth, sitzen dabei breitbasig dem Außenstreifen auf, verschmälern sich nach oben, erreichen mit ihren Spitzen jedoch nicht die Nierenoberfläche, sondern werden hier von einem dünnen Labyrinthanteil dem Cortex corticis, überdacht. Jeder Markstrahl ist allseits von Labyrinth umgeben und damit von anderen Markstrahlen getrennt.

Im Rindenlabyrinth liegen Gefäße, die Nierenkörperchen und die gewundenen Haupt- und Mittelstücke.

Die Markstrahlen enthalten die geraden Haupt- und Mittelstücke und die Sammelrohre.

Der Außenstreifen

Der Außenstreifen ist aus den gleichen Tubulusabschnitten zusammengesetzt wie die Markstrahlen, aus geraden Haupt-

und Mittelstücken und aus Sammelrohren.
Die Grenze zwischen Rinde und Außenstreifen bildet eine gedachte Ebene, der die unteren Anteile des Rindenlabyrinthes aufsitzen. Im Verlauf des Außenstreifen variiert die Markstrahlentextur.

Der Innenstreifen
Die Grenze zwischen Außenstreifen und Innenstreifen ist gekennzeichnet durch den Übergang der geraden Hauptstücke in die Übergangsstücke. Etwa zwei Drittel aller Überleitungsstücke - also die kurzen Schleifen - biegen im unteren Drittel des Innenstreifens in die aufsteigenden Mittelstücke um. Der Übergang des Überleitungsstückes in das Mittelstück liegt dabei immer in Nähe des Schleifenscheitels.

Die Innenzone
Die Grenze zwischen Innenstreifen und Innenzone ist gekennzeichnet durch den Übergang der aufsteigenden Überleitungsstücke in die Mittelstücke der langen Schleifen. In der Innenzone findet man an Tubulusabschnitten nur noch Sammelrohre und Überleitungsstücke. Die Übergänge der ab- in die aufsteigenden Überleitungsstücke und auch die Vereinigungsstellen der Sammelrohre verteilen sich gleichmäßig über die gesamte Innenzone.

2.2. Biologische Membranen

Die Bausteine biologischer Membranen sind Proteine und Lipide.

2.2.1. Phospholipide

Die Lipide der Membranen sind vorwiegend Phospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin). Die Zusammensetzung ist für die Art der Membran und für das betreffende Organ typisch; das gilt besonders für den Gehalt der Phospholipide an ungesättigten Fettsäuren. Wegen der Verbindung lipophiler und hydrophiler Bereiche in einem Molekül sind die Phospholipide ideale Bausteine für biologische Grenzflächen. Die Kohlenwasserstoffketten erzeugen durch Lipid-Lipid-Wechselwirkung eine apolare Barriere, die mit hydrophoben Bereichen in Membranproteinen in Beziehung treten kann. Elektrostatische Bindung von Kationen sowie die Bildung ternärer Komplexe sind dagegen an polare Strukturen in Phospholipiden gebunden.
Phospholipide sind nach heutiger Auffassung für den Bau aller biologischen Membranen entscheidend. Die Grenzflächeneigenschaften von Membranen werden jedenfalls durch die Struktur der Lipide sehr stark beeinflußt, allerdings soll in diesem Zusammenhang der sicher wesentliche Einfluß von Proteinen nicht vergessen werden (3).

2.2.2. Hormonrezeptoren

Die Oberfläche der Zellmembran enthält Rezeptoren zur Bindung der verschiedensten Substanzen, unter anderem auch für Hormone und hormonähnliche Stoffe. Die Hormonrezeptoren der Membranoberfläche sind meist Proteine.

Wenn der Rezeptor mit Hormon beladen ist, dann aktiviert er die gleichfalls membranständige Adenylat-Cyclase, die im Inneren der Zelle ihr aktives Zentrum besitzt und ATP in Cyclo-AMP umwandelt.
Das Cyclo-AMP wirkt als second messenger.
Ein Molekül Adenylat-Cyclase kann mit mehreren Hormonrezeptoren in der Membran zusammenwirken. Es ist anzunehmen, daß die Hormonrezeptoren in der Membran lateral-beweglich angeordnet sind, und daß sie nach Besetzung mit Hormon eine hohe Affinität zur Adenylat-Cyclase entfalten (2).

2.3. Lipidstoffwechsel

Fettsäureabbau und Fettsäuresynthese sind voneinander räumlich getrennt: Acetyl-CoA, welches in den Mitochondrien entsteht, kann nicht direkt zur Fettsäuresynthese Verwendung finden. Es muß zunächst ausgeschleust werden. Dies geschieht über Citrat, das als Transportmetabolit fungiert. Damit wird der Citratzyklus zu einer wichtigen Schaltstelle:
Läuft der Citratzyklus mit voller Geschwindigkeit zur ATP-Produktion, dann wird kein Citrat ausgeschleust. Ist der Citratzyklus dagegen gehemmt durch ATP-Überschuß, so wird Citrat ausgeschleust und kann im Cytosol das zur Fettsäuresynthese benötigte Acetyl-CoA liefern.
Außer dieser indirekten Regulation gibt es noch eine direkte Endprodukthemmung: Palmitoyl-CoA hemmt die Acetyl-CoA-Carboxylase und unterdrückt damit die Synthese von Malonyl-CoA, das für die Fettsäuresynthese benötigt wird.
Es gibt noch zwei membrangebundene Enzymsysteme, außer der im Cytosol lokalisierten Fettsäuresynthese, die aktivierte Essigsäure in Fettsäure einbauen. Sie dienen allerdings nicht der de novo Synthese, sondern nur der Kettenverlängerung.

2.3.1. Biosynthese der Phospholipide

Für den Stoffwechsel der Phospholipide sind vier mögliche Synthesewege bekannt (60):

1. Die Bildung von Phosphatidylcholin durch schrittweise Methylierung von Phosphatidylethanolamin. Als Methylgruppendonator fungiert z.B. s-Adenosyl-Methionin.
   Dieser Weg ist nur für die Leber und Niere wahrscheinlich gemacht worden.

2. In vitro können Cholin, Ethanolamin und Serin über einen durch Ca^{++}-Ionen stimulierten Austausch der in den Phospholipiden vorhandenen Basen in die Phospholipide eingebaut werden.
3. Die Bildung von Phosphatidylcholin aus Lysophosphatidylcholin. Van den Bosch et al (36) schlagen zwei Möglichkeiten zur Bildung des Phosphatidylcholins vor:

   Lysophosphatidylcholin + Fettsäure CoA = Phosphatidylcholin

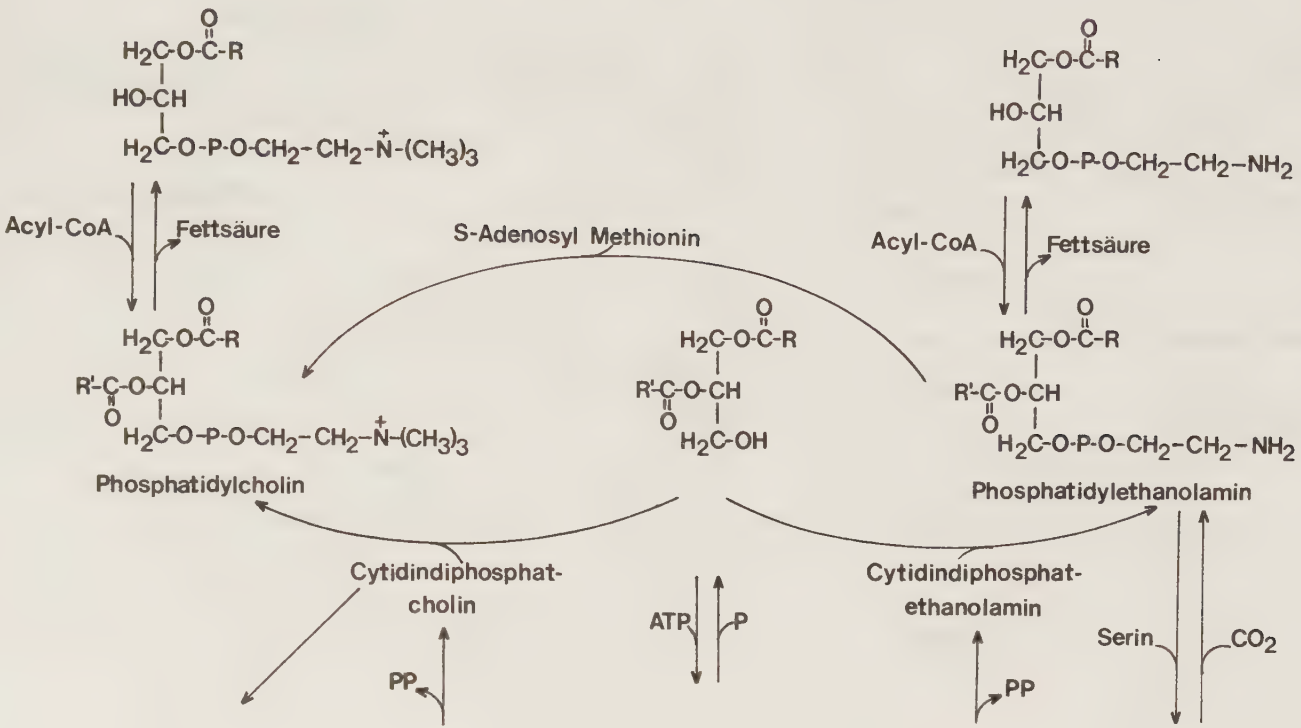
   2 Lysophosphatidylcholin = Phosphatidylcholin + Glycerylphosphorylcholin

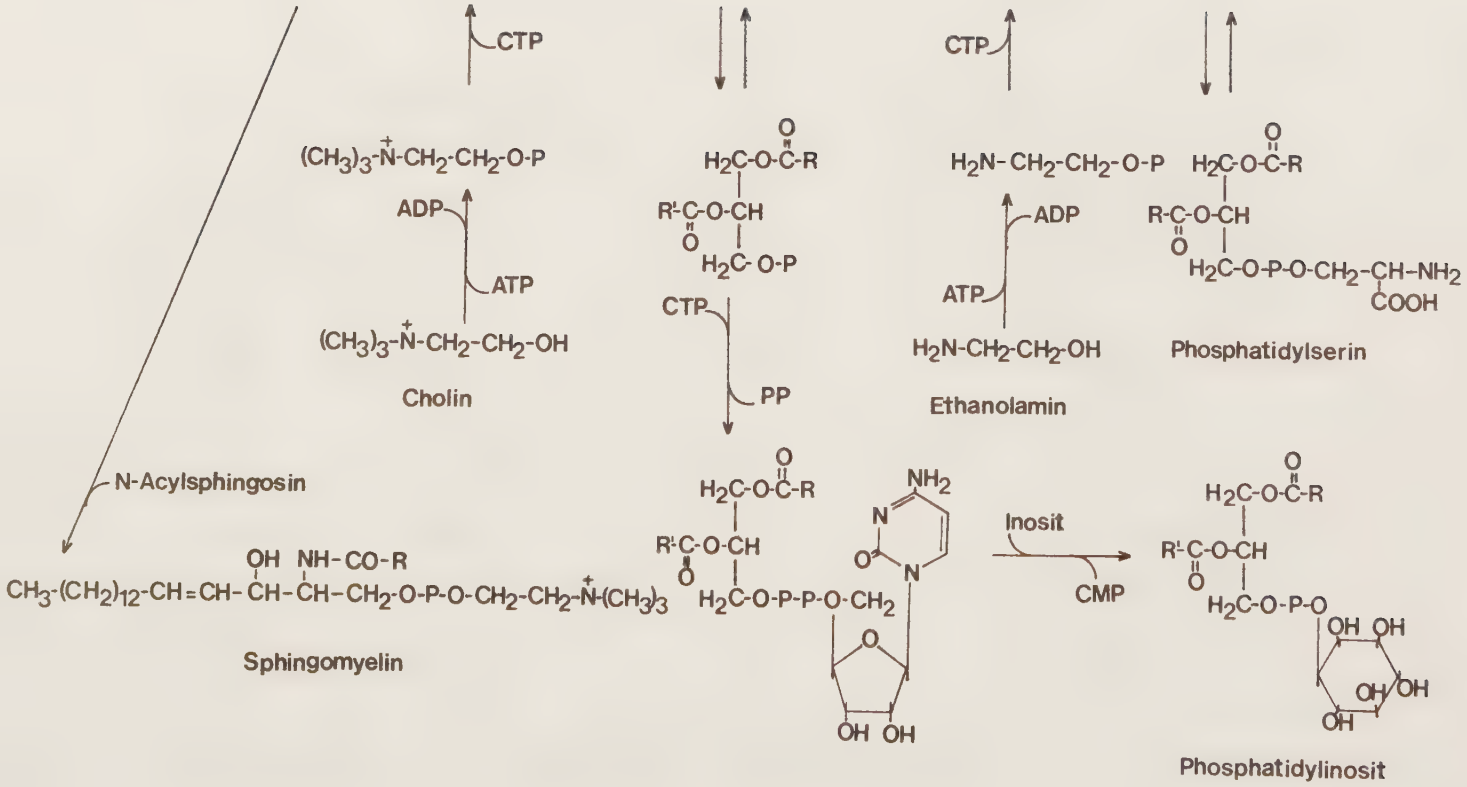
   Scherphof und van Deenen (26) fanden bei Applikation von C^{14}-Palmitinsäure einen bevorzugten Einbau in Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin von Leberzellmembranen. Die Autoren führen dies im wesentlichen auf die Acylierung von Lysophosphoglyceride zurück und halten diesen Weg für den bedeutsamsten bei der Aufnahme von Fettsäuren in Phospholipide.
4. Die Bildung von Phosphatidylcholin aus Cholin über Phosphorylcholin und CDP-Cholin ("Kennedy-Weg"). Wenn vermehrt Phosphatidylethanolamin abgebaut wird, könnte dies theoretisch auch zu einer Mehrsynthese von Phosphatidylserin führen. Dies ist neben der Methylierung zu Phosphatidylcholin denkbar.

In der nachgestellten Abb. 6 ist die Biosynthese der wichtigsten Phospholipide nach Gurr und James (27) dargestellt.

Biosynthese der wichtigsten Phospholipide

Abb. 6




CTP
ADP
ATP
Cholin
CTP
PP
CTP
ADP
ATP
Ethanolamin
Phosphatidylserin
N-Acylsphingosin
Sphingomyelin
Inosit
CMP
Phosphatidylinosit

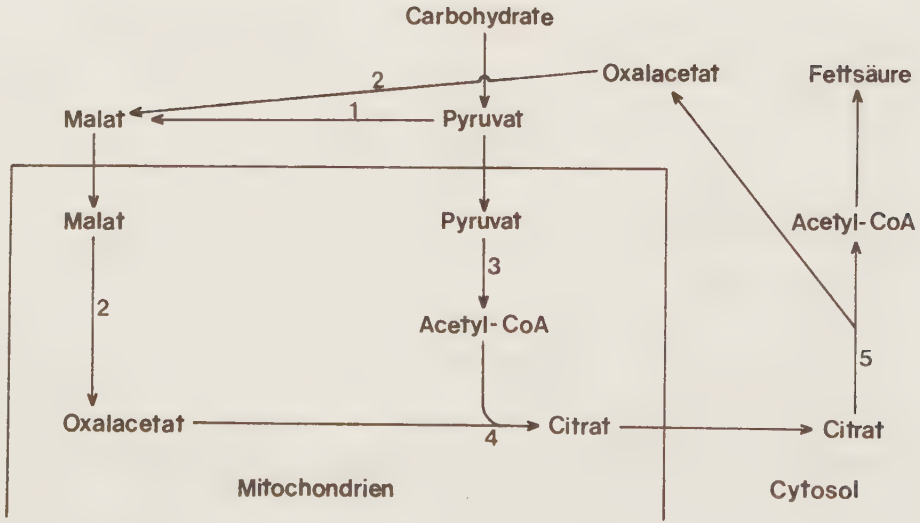
2.3.2. Enzyme des Lipidstoffwechsels

ATP-Citrat Lyase, Malic Enzym und Glucose-6-phosphatdehydrogenase - Ihre Rolle in der Lipogenese

Eine wichtige Aufgabe der biologischen Membranen ist die kontrollierte Aufnahme und Abgabe von chemischen Stoffen. Wichtig sind vor allem die Carriertransporte, bei denen ein bestimmter Träger den Transport übernimmt.
Als Beispiel für eine hoch organisierte Gruppe von Transportsystemen wird die innere Mitochondrienmembran betrachtet. Viele wichtige Stoffwechselvorgänge laufen im Cytosol ab, während andere wichtige Stoffwechselvorgänge im Matrixraum der Mitochondrien lokalisiert sind.
Wichtigstes Substrat der Mitochondrien aus dem Kohlenhydratstoffwechsel ist das Pyruvat, das ohne Schwierigkeiten in die Mitochondrien gelangt und dort zum Acetyl-CoA oxidativ decarboxyliert wird. Diese oxidative Decarboxylierung ist gleichzeitig eine Schlüsselreaktion bei der Umwandlung von Kohlenhydrat in Fett; da aber die Fettsynthese extramitochondral erfolgt, muß die "aktivierte Essigsäure" wieder ausgeschleust werden. Dies geschieht durch Kondensation mit Oxalacetat zu Citrat. Citrat verläßt die Mitochondrien und wird im Cytosol durch die ATP-Citrat Lyase (auch Citrat Cleavage Enzym genannt) wieder in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Dabei wird 1 ATP verbracht und somit liegt das Gleichgewicht auf Seiten der Spaltung. Das Oxalacetat wird wieder zu Malat reduziert, welches die Mitochondrienmembran passiert. Der Transport von Citrat ist mit dem von Malat gekoppelt. Es wird pro Mol ausgeschleustes Citrat ein Mol Malat

Stoffwechselvorgänge an der Mitochondrienmembran

Abb. 7



1 Malic Enzym, 2 Malat-Dehydrogenase, 3 Pyruvat-Oxidase, 4 Citrat-Synthase

5 ATP-Citrat-Lyase

in die Mitochondrien aufgenommen. Dies ist wichtig, damit die Mitochondrien nicht an C_4-Dicarbonsäuren verarmen. Zu den Stoffwechselvorgängen an der Mitochondrienmembran siehe auch Abb. 7.
Bei ihren Untersuchungen an erwachsenen Wüstenheuschrecken kamen Walker und Bailey (37) zu den folgenden Ergebnissen:
Die Aktivitätsänderung von ATP-Citrat-Lyase entspricht nicht der Aktivitätsänderung des Malic-Enzyms. Die Muster des Acetateinbaues in Lipide korrelieren jedoch miteinander.
Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß nur ATP-Citrat-Lyase als Quelle des Acetyl-CoA fungiert, ohne Einbeziehung von Malic-Enzym. Die Resultate stimmen aber mit der These überein, daß Malic-Enzym die Bildung von Malat aus Pyruvat katalysiert.
Der Aktivitätsabfall des Malic-Enzyms und die gleichzeitige Aktivitätssteigerung der ATP-Citrat-Lyase, sowie der Anstieg der Lipogenese wurden von den Autoren damit begründet, daß das Malic-Enzym überflüssig wird, sobald der intercelluläre Malatspiegel stabilisiert wurde.
NADPH für die Lipogenese wird durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase bereitgestellt.
Kornacker und Ball (38) behaupten dagegen, daß ATP-Citrat-Lyase und Malic-Enzym im Fettgewebe, in einer Folge von Reaktionen, Acetyl-CoA und NADPH für die Lipogenese bereitstellen.

2.4. Antidiuretisches Hormon (ADH)

2.4.1. Chemische Zusammensetzung

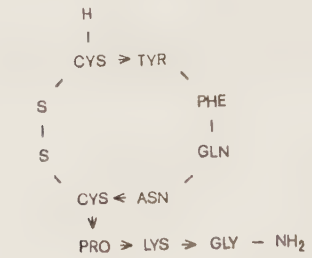


Abb. 8: Die chemische Zusammensetzung von ADH (auch Vasopressin genannt)

Antidiuretisches Hormon ist ein Nonapeptid, das eine Disulfidbrücke enthält (2). Es wird aus den Hypophysenhinterlappen freigesetzt.

2.4.2. Physiologische Aufgabe

Obgleich die Wasserresorption ein passiver Vorgang ist, die der Resorption von Na^+-Ionen folgt, kann der Wasserhaushalt unabhängig vom Na^+-Ionen-Haushalt reguliert werden. Dies wird ermöglicht durch die Veränderung des ADH im Blut, wodurch die von den distalen Tubuli und Sammelrohren resorbierte Wassermenge reguliert wird.
Wenn die Konzentration von ADH hoch ist, ist auch die Wasserpermeabilität dieser Nephronabschnitte hoch. Die Folge davon ist, daß viel Wasser resorbiert und hypertoner Harn gebildet wird. Umgekehrt vermindert eine niedrige Konzentration an ADH die Wasserpermeabilität der distalen Tubuli und Sammelrohre. Dies bewirkt eine geringe Wasserresorption in diesen Ab-

schnitten und die Bildung von hypotonem Harn.
Bei einer hohen ADH-Konzentration im Blut sind die Membranen, welche die distalen Tubuli und Sammelrohre auskleiden, hochgradig wasserdurchlässig. Daher diffundiert Wasser in diesen tubulären Segmenten passiv entlang dem osmotischen Druckgefälle zwischen intratubulärer Flüssigkeit und dem Rinden-, Mark- und Papillenlnterstitium.
Auf diese Weise wird die Tubulusflüssigkeit konzentriert, bis ein osmotisches Gleichgewicht mit dem Interstitium erreicht ist; diese zunehmende Konzentrierung der intratubularen Flüssigkeit findet

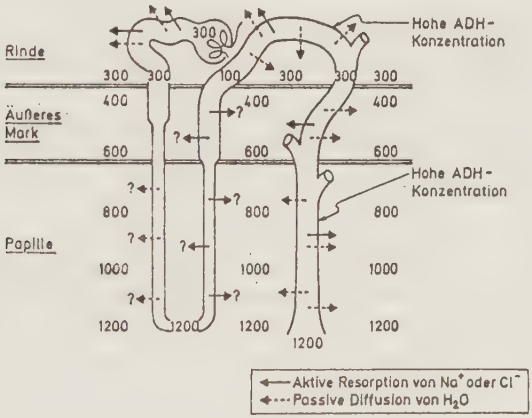


Abb. 9: Der Gegenstrommechanismus bei einem gesunden Menschen während der Antidiurese (nach H. Valtin, Funktion der Niere)

statt trotz einer gewissen Na^+-Ionen-Resorption in den distalen Tubuli und Sammelrohren.

3. Methoden

3.1. Reinigung des Rinderalbumins nach Chen

Serum-Albumin-Präparate weisen verschiedene Mengen an Fettbestandteilen auf. Diese Verunreinigungen treten nicht nur bei Substanzen auf, die fraktioniert hergestellt werden, sondern auch bei kristallinen Human-Serum-Albumin und Rinderalbumin. Die fremden Bestandteile setzen sich aus verschiedenen Fettsäuren zusammen. Da diese schon an das Albumin gebunden sind, verhindern sie so eine Bindung von radioaktiv markierter Fettsäure, welche für die folgenden Versuche benötigt wird.
Um eine vollständige Bindung der radioaktiv markierten Fettsäure zu garantieren, muß das verwendete Albumin einer Reinigung unterzogen werden.
Nach der Methode von Chen (7) wird eine 10%ige Albuminlösung (7 g Albumin + 70 ml dest. H_2O) mit Aktivkohle (3 g) versetzt und mit 0,2 N HCl auf einen pH-Wert von 3 gebracht. Nach einstündigem Rühren im Eisbad, wird die Aktivkohle durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 20 000 U/min je 20 Minuten bei 4°C entfernt.
Den klaren Überstand bringt man mit 2 N NaOH wieder auf einen pH-Wert von 7.

3.2. Bindung der 1-C^{14}-Palmitinsäure

Die radioaktiv markierte Palmitinsäure befindet sich in Lösung. Aus diesem Grund wird zunächst das Lösungsmittel Toluol mittels Stickstoff vertrieben.
In der Zwischenzeit temperiert man 17,5 ml einer 10%igen Albuminlösung auf 42°C.
Ist das Lösungsmittel der Palmitinsäure entfernt, gibt man zu dem Rückstand je 500 µl dest. Wasser und erhitzt im siedenden Wasserbad bis sich der Rückstand

vollkommen gelöst hat. Dann gibt man die heiße Lösung der Palmitinsäure unter ständigem Rühren in die auf 42°C temperierte Albuminlösung. Dabei darf keine Trübung entstehen, da sonst das Albumin denaturiert ist.
Die abgekühlte Lösung wird dann zu je 500 µl in Spritzen aufgezogen und eingefroren.

3.3. Gewinnung des Nierenhomogenates

Nachdem die Tiere getötet wurden, werden die entnommenen Nieren sofort in eisgekühlten Puffer (50mM Mannit, 2mM Tris/HCl, pH 7) gelegt. Nach fünf Minuten wird (auf einer in Eis eingeschlossenen Petrischale) mit einer Rasierklinge und chirurgischen Pinzetten die Nierenkapsel entfernt. Dann werden die Nieren in je zwei Hälften geteilt, zerhackt und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator nach Potter und Elvehjem (Toleranz 0,11 - 0,15 mm) manuell homogenisiert.

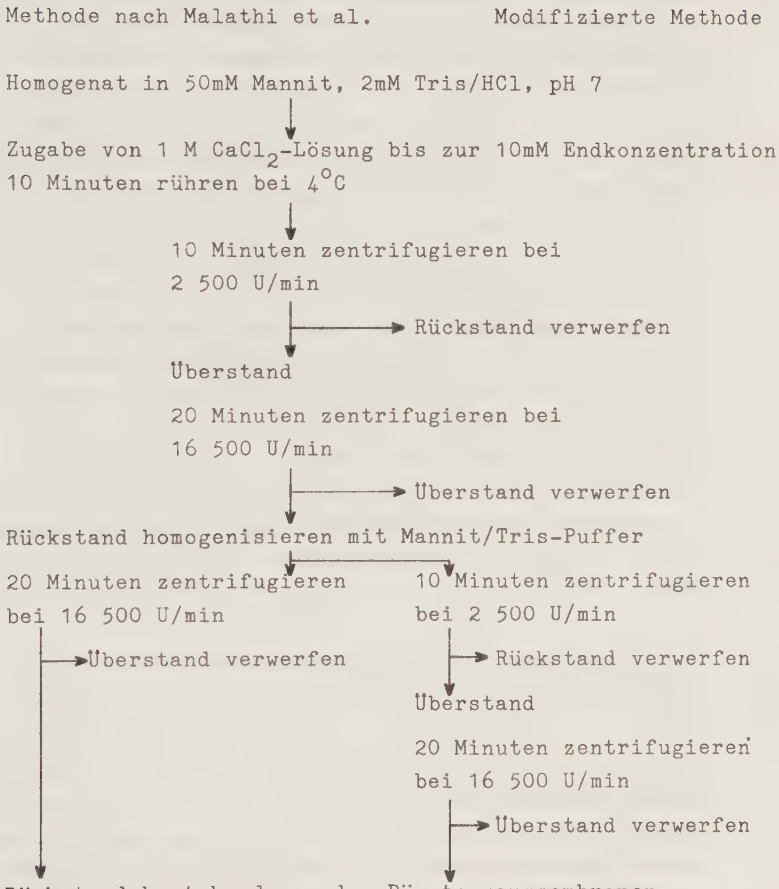
3.4. Präparation der Bürstensaummembranen

Membranen aus dem Gewebe von Meerschweinchen isolierten Coleman und Finean (10) nach einer Methode von Neville (11). Diese Methode wurde von Emmelot et al. (12) modifiziert. Nach diesem Verfahren wurde die Niere in 1mM hypoosmotischer $NaHCO_3$-Lösung homogenisiert und die Plasmamembranen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert.
Ein ähnliches Verfahren zur Isolierung der Plasmamembranen aus der Rattenniere wurde von Manitius et al (13) angewandt.
Oberflächenmembranfragmente aus der Rattenniere wurden ebenfalls unter isoosmotischen Bedingungen von Fitzpatrick et al. (14) und von Kinne und Kinne-Saffran (15) isoliert.

Thuneberg und Rostgaard (16) isolierten, wie auch Berger und Sacktor (17), intakte Bürstensaumfragmente aus einer Kaninchenniere mit hypoosmotischer 0,5 M Saccharoselösung.
Wilfong und Neville (18) erzielten eine höhere Anreicherung der Bürstensaummembranen der Niere, indem sie zur Homogenisation der Nieren eine 20mM $NaHCO_3$-Lösung verwendeten.
Schmitz et al. (19) beschrieben zum ersten Mal eine Methode, bei der die Membranproteine als Calcium- oder Magnesiumkomplexe ausgefällt werden.
1974 veröffentlichten Booth und Kenny (20) ein Verfahren zur Isolierung von Bürstensaummembranproteinen aus der Kaninchenniere als Magnesiumkomplex. Sie berichteten, daß eine Ausfällung sowohl mit Calcium- als auch mit Magnesiumsalzen möglich ist.
Die Aggregation der Proteine erfolgt aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit. Eine zu hohe Salzkonzentration verhindert ein Ausfallen.
Evers et al. (21) verglichen 1978 dieses Verfahren mit der Isolierung über Dichtegradientenzentrifugation in Saccharose und kamen zu dem Ergebnis, daß mit der neuen Technik Material gleicher Reinheit zu gewinnen sei, bei geringerem zeitlichen und technischem Aufwand. Die isolierten Bürstensaummembranen wurden im Vergleich zum Ausgangshomogenat elffach angereichert.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neuartige Modifikation des von Malathi et al. (8) beschriebenen Verfahrens angewandt.
Bei der Methode wird ein hypoosmotisches Medium verwendet, die Proteine werden durch Ca^{++}-Ionen ausgefällt und die Bürstensaummembranen durch Differentialzentrifugation isoliert.

Schematische Darstellung zur Präparation der Bürstensaummembranen



Arbeitsgang: Die zerhackten Nieren werden in 30 ml eisgekühlten Puffer, bestehend aus 50mM Mannit und 2mM Tris/HCl und einem pH-Wert von 7,0 homogenisiert. Dem Homogenat werden 300 µl 1 M $CaCl_2$-Lösung zugesetzt und zehn Minuten im Eisbad gerührt. Dann gibt man nochmals 20 ml Puffer und 200 µl 1 M $CaCl_2$-Lösung zu, rührt fünf Minuten und überführt in Zentrifugenröhrchen.
Es wird zehn Minuten bei 2 500 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Rückstand wird verworfen und der Überstand weiter verarbeitet. Man zentrifugiert den Überstand bei 16 500 U/min zwanzig Minuten bei 4°C.
Nun wird der Überstand verworfen, der Rückstand wird zunächst mit 500 µl Puffer homogenisiert, dann gibt man noch 5 ml Puffer und 50 µl 1 M $CaCl_2$-Lösung zu. Es wird erneut bei 2 500 U/min zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Zentrifugenröhrchen überführt und zwanzig Minuten bei 16 500 U/min und 4°C zentrifugiert.
Der Überstand wird verworfen; der Rückstand, die Bürstensaummembranen, wird in flüssigem Stickstoff gefroren. Die gefrorenen Bürstensaummembranen werden zur Fettextraktion in Glasröhrchen mit Schliff überführt.

3.5. Extraktion der Lipide nach Folch

Die Extraktion der Lipide erfolgte im wesentlichen nach der von Folch, Less und Stanley (9) beschriebenen Methode; das heißt, mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol und einer Salzlösung (0,04%ige $CaCl_2$-Lösung).
Arbeitsgang: Zu den, in den Glasröhrchen befindlichen Bürstensaummembranen (s. Punkt 3.4.) gibt man 2 ml Extraktionsgemisch, bestehend aus Chloroform - Methanol im Verhältnis 2:1 (v/v). Es wird zehn Minuten geschüttelt,

dann werden 0,7 ml 0,04%ige $CaCl_2$-Lösung zugesetzt, erneut zehn Minuten geschüttelt und die organische Phase mittels einer Pipette abgesaugt und gesammelt. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Dann wird das Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft. Der Rückstand wird in 200 µl Extraktionsgemisch aufgenommen. Je 100 µl werden zur dünnschichtchromatographischen Trennung der Phospholipide und Neutralfette herangezogen.

3.6. Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode (22).
50 µl Homogenat und 50 µl Membransuspension sowie 50 µl Puffer (50mM Mannit, 2mM Tris/HCl, pH-Wert 7) als Blindwert werden mit 500 µl 0,2 N Natronlauge und 500 µl Biuretreagenz gemischt und nach 30 Minuten in eine Halbmikroküvette gegeben.
Die Extinktion wird bei 546 nm mit einem Zeiss-Photometer gemessen.

$$E_{Probe} - E_{Leerwert} = E$$

$$E \times 59{,}5 = \text{mg Protein/ml}$$

$$\text{Faktor für 50 µl} = 59{,}5$$

$$\text{Faktor} = \frac{2{,}84 \times \text{Küvetteninhalt (µl)}}{\text{eingesetzte Extrakte (µl)}}$$

Der Faktor 2,84 wurde ermittelt, indem der Stickstoffgehalt aus Rattennierengewebe und Rinderalbumin mit der Kjeldahlmethode bestimmt wurde. Mit Hilfe der bekannten Biuretfaktoren, für Rinderalbumin 16,5, wurde der entsprechende Faktor für Nierenprotein errechnet.

3.7. Bestimmung der alkalischen Phosphatase - ein Enzym der Bürstensaummembran

Die charakteristischen Enzyme der Bürstensaummembran sind: Maltase, Trehalase, alkalische Phosphatase (AP), γ-Glutamyltransferase und Leucylnaphtylamidase.
Bei den eigenen Untersuchungen wurde nur die alkalische Phosphatase als Indikator für die Anreicherung der Membranen bestimmt.
Die Bestimmung erfolgte mit dem Monotest für alkalische Phosphatase von Boehringer Mannheim (Nr. 123 846).

Testprinzip:

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow{AP} \text{Phosphat} + \text{p-Nitrophenol}$$

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden.

4. Voruntersuchungen

4.1. Anreicherungsversuche der Membran

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob die angewandte Methode zur Präparation der Bürstensaummembranen reproduzierbare Werte liefert und welcher Anreicherungsfaktor sich daraus ergibt.
Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurde sowohl beim Ausgangshomogenat als auch beim Endprodukt (Bürstensäume) bestimmt. Durch den Vergleich der Meßwerte ergab sich die im Laufe der Isolierung erzielte Anreicherung. Ebenso wurde beim Endprodukt das Gesamteiweiß, nach der Biuretmethode (22) bestimmt.
In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der elf durchgeführten Versuche zusammengefasst.
Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, können mit der angewandten Methode relativ gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.
Tabelle 2 vergleicht die Meßergebnisse der angewandten Methode mit den bei Malathi et al. erzielten Resultaten (8). In dieser Gegenüberstellung wird die Anreicherung der beiden Methoden anhand der alkalischen Phoshpatase untersucht.
Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, kann mit dem in der angewandten Methode zusätzlich eingefügten Zentrifugationsschritt eine fast um das Doppelte gesteigerte Anreicherung erzielt werden.

4.2. Versuche zur Bindung der Fettsäure an Albumin

Um die Frage zu klären, welches Albumin sich am besten zur Bindung der radioaktiv markierten Fettsäure eignet, wurde 1-C^{14}-Palmitinsäure an Rinderalbumin der Fa. Sigma und an Humanalbumin der Fa.

Tabelle 1: Aktivität der alkalischen Phosphatase in U/l bezogen auf 1 mg Protein

Homogenat (H)	Membran (M)	Relative Aktivität (M/H)	Gesamt-eiweiß (mg)
127,9	1848,0	14,4	5,3
100,5	1434,8	14,3	4,9
116,9	1618,9	13,8	5,1
84,9	1119,6	13,2	4,7
106,3	1269,2	11,9	4,2
121,9	1586,5	13,0	5,1
106,0	1058,5	10,0	3,8
139,4	1914,3	13,7	5,2
107,7	1404,2	13,0	5,0
115,9	1077,9	9,3	4,0
139,1	1358,5	9,8	4,2
Mittelwerte und Standardabweichung n=11			
115,1 ± 16,5	1426,4 ± 293,1	12,4 ± 1,8	4,7 ± 0,5

Tabelle 2: Vergleich der von Malathi et al. beschriebenen Methode mit der angewandten Methode.

Es wird die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in U/l bezogen auf 1 mg Protein gemessen.

Methode	n	Homogenat (H)	Membran (M)	Relative Aktivität (M/H)
Malathi et al.	7	139,6 ± 41,8	947,0 ± 184,4	6,8
Modifizierte Methode	11	115,1 ± 16,5	1426,4 ± 193,1	12,4

Behringwerke gebunden. Die Methode wurde unter Punkt 3.2. beschrieben.
Die radioaktiv markierte Palmitinsäure hatte in beiden Versuchen die gleiche spezifische Aktivität.
Je drei Ratten des gleichen Körpergewichtes wurde die an Rinderalbumin bzw. Humanalbumin gebundene 1-C^{14}-Palmitinsäure injiziert. Nach 120 Minuten wurden die Tiere getötet, die Nieren sofort entnommen und die Bürstensaummembranen isoliert (s. Punkt 3.3. und 3.4.).
Die Lipide der Membranen wurden nach der unter Punkt 3.5. beschriebenen Methode extrahiert. Anschließend wurden die Lipide dünnschichtchromatographisch getrennt und die radioaktiven Einbauraten mittels Flüssigkeitsszintographie bestimmt.
Der Versuch führte zu folgendem Ergebnis:
Das verwendete Rinderalbumin eignet sich nicht zur Bindung der 1-C^{14}-Palmitinsäure. Die Phospholipide der Bürstensaummembranen zeigten keinerlei radioaktiven Einbauraten. Man kann davon ausgehen, daß eine Bindung der markierten Fettsäure an das Rinderalbumin nicht stattgefunden hat.
Das Humanalbumin eignet sich gut zur Bindung der radioaktiv markierten Fettsäure. Hier wurden gut meßbare radioaktive Einbauraten des C^{14} in die Phospholipide erreicht.
Es stellte sich nun die Frage, ob eine Reinigung des Rinderalbumins nach Chen (7) bessere Ergebnisse erzielen würde (s. Punkt 3.1.).
Aus diesem Grund wurde das Rinderalbumin nach der von Chen beschriebenen Methode gereinigt und der oben beschriebene Versuch wiederholt.
Doch auch mit diesem gereinigtem Rinderalbumin konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden.
Für alle weiteren Versuche wurde das Humanalbumin der Fa. Behringwerke verwendet.

4.3. Radioaktiv markierte Fettsäure

Welche Fettsäure, 1-C^{14}- oder U-C^{14}-Palmitinsäure, eignet sich am besten für die Versuche zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels?
Palmitinsäure wurde aus versuchstechnischen Gründen der Ölsäure vorgezogen (bessere Wasserlöslichkeit).
Je drei Ratten des gleichen Körpergewichtes wurde 1-C^{14}- bzw. U-C^{14}-Palmitinsäure (an Humanalbumin gebunden), injiziert. Nach 120 Minuten wurden die Tiere durch einen Schlag ins Genick getötet und die Nieren sofort entnommen. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem unter Punkt 4.2. beschriebenen.
Der Versuch führte zu folgendem Ergebnis:
1-C^{14}-Palmitinsäure liefert höhere Einbauraten als U-C^{14}-Palmitinsäure.
Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche 1-C^{14}-Palmitinsäure verwendet.

4.4. Kurze Zusammenfassung der Voruntersuchungen

Die unter Punkt 3.4. beschriebene Methode zur Isolierung der Bürstensaummembranen der Rattenniere liefert gut reproduzierbare Ergebnisse. Durch das Einfügen eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes in die von Malathi et al. (8) beschriebene Methode, wurde eine um fast das Doppelte gesteigerte Anreicherung der Bürstensaummembranen erreicht.
Zur Bindung der radioaktiv markierten Palmitinsäure eignet sich am besten das Humanalbumin der Fa. Behringwerke. Die Reinigung des Rinderalbumins nach Chen (7) konnte keine besseren Ergebnisse erzielen.
Es zeigte sich auch, daß 1-C^{14}-Palmitinsäure besser für die folgenden Versuche geeignet ist als U-C^{14}-Palmitinsäure.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden.

5. Chromatographische Trennmethoden der Lipide

Im folgenden Teil der Arbeit sollen einige chromatographische Methoden zur Trennung und Charakterisierung der Lipide der Bürstensaummembranen, insbesondere der Phospholipide dieser Membranen, beschrieben werden.

5.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie hat sich einen festen Platz unter den chemisch-analytischen Methoden erobert. Dazu haben die besonderen Vorteile dieses Analysenverfahrens gegenüber den bisher gebräuchlichen chromatographischen Techniken beigetragen. Es sind hier zu nennen die Geschwindigkeit der Auftrennung von Substanzgemischen, die gute Trennschärfe und die hohe Nachweisempfindlichkeit.
Bei der Dünnschichtchromatographie erfolgt die Trennung auf einer Glasplatte oder Aluminiumfolie, die mit einem geeigneten Adsorptionsmittel beschichtet sind. Zur besseren Haftfähigkeit enthält das Adsorptionsmittel meist Gips. Zum Einsatz kommen Kieselgel, Kieselgur, Aluminiumoxid, Polyamide, Zellulose oder Dextran. Nach dem Auftragen und Trocknen der Substanzmischung stellt man die Platte oder Folie in eine sogenannte Entwicklungskammer. Das Fließmittel wird kapillar angesaugt. Die Trennung erfolgt auf Grund von Adsorptions-, Verteilungs- und Ionenaustauschvorgängen. Das Verhältnis der Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Lösungsmittels nennt man R_f-Wert, der von dem betreffenden Stoff und den vorliegenden Arbeitsbedingungen abhängig ist.
Die Identifizierung der getrennten Substanzen erfolgt nach der Trocknung der Chromatogramme auf chemischem oder physikalsichem Weg.

5.2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide und Bestimmung der radioaktiven Einbauraten

Nach Injektion von 1-C^{14}-Palmitinsäure an Sprague-Dawley-Ratten wurden die Lipide der Bürstensaummembranen der Niere dünnschichtchromatographisch getrennt und die radioaktiven Einbauraten mittels Flüssigkeitsszintographie bestimmt.

5.2.1. Versuchstiere

Versuchstiere waren männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 260 ± 20 g. Die Tiere hatten freien Zugang zu standardisierter Kost und Leitungswasser ad libitum.

5.2.2. Versuchsdurchführung

Um zu sehen, wie sich die Phospholipide und Neutralfette der Rattenniere nach einer Injektion von 1-C^{14}-Palmitinsäure in die Schwanzvene verhalten, wurde der folgende Versuch durchgeführt:
Zu jedem Versuch gehörten drei Ratten des gleichen Körpergewichtes. Es wurden je 500 µl einer an Humanalbumin gebundenen 1-C^{14}-Palmitinsäure injiziert. Die spezifische Aktivität pro 500 µl (pro Spritze) betrug:

3,7 mCi/mMol
14,2 µCi/mg

Die Injektionen erfolgten zur Vermeidung von Stress und Arbeitsplatzkontamination unter Halothannarkose. Die Tiere wurden in 60 Minutenabständen gespritzt, d.h. das erste Tier 180 Minuten, das zweite Tier 120 Minuten und das dritte Tier 60 Minuten vor dem Eintreten des Todes. Alle drei Tiere wurden zur gleichen

Zeit getötet, die Nieren sofort entnommen und in eisgekühlten Puffer gelegt. Anschließend wurden die Bürstensaummembranen isoliert (Methode siehe Punkt 3.3. und 3.4.).
Zur Trennung der Lipide wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen.

Trennung der Phospholipide
Als stationäre Phase wurden Aluminiumfolien, mit 0,25 mm Kieselgel 60 beschichtet, verwendet.
Mit dem, von Skipsky und Barclay (23) beschriebenen Laufmittel, bestehend aus Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser im Verhältnis 25:15:4:2 (v/v), wurde die beste Trennung der Phospholipide erreicht.
Zur Sichtbarmachung der Flecke wurde die Platte nach der Entwicklung und dem Trocknen in eine, mit Joddampf gesättigte Dünnschichtkammer gestellt. Nach fünf Minuten wurde die Platte herausgenommen und die Zonen mit Bleistift umrandet. Ein solches Dünnschichtchromatogramm zeigt Abb. 10.

Trennung der Neutralfette
Auch hier wurden Aluminiumfolien, die mit 0,25 mm Kieselgel 60 beschichtet waren, verwendet.
Als mobile Phase wurde das von Stüve (24) beschriebene Laufmittel, bestehend aus Petroleumbenzin (Sdp. 40°C)-Diethylether - Eisessig im Verhältnis 84:15:1 (v/v), verwendet.
Die Sichtbarmachung erfolgte wie oben bei den Phospholipiden beschrieben, mit Joddampf. Ein Dünnschichtchromatogramm der Neutralfette zeigt Abb. 11.
Eine Imprägnierung der Kieselgelplatte mit 10%iger Silbernitratlösung (nach Merck), sowie die Verwendung von Silicagelplatten brachten keine befriedigenden Ergebnisse.
Die Trennung der einzelnen Substanzen ist nur dann

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER PHOSPHOLIPIDE

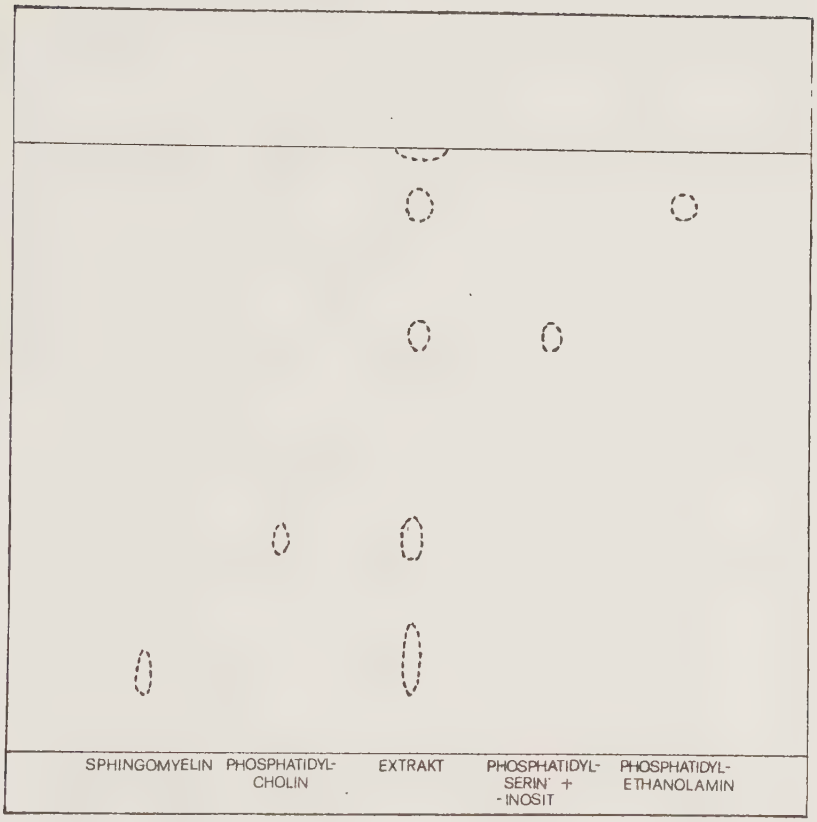


Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm der Phospholipide der Bürstensaummembranen der Rattenniere

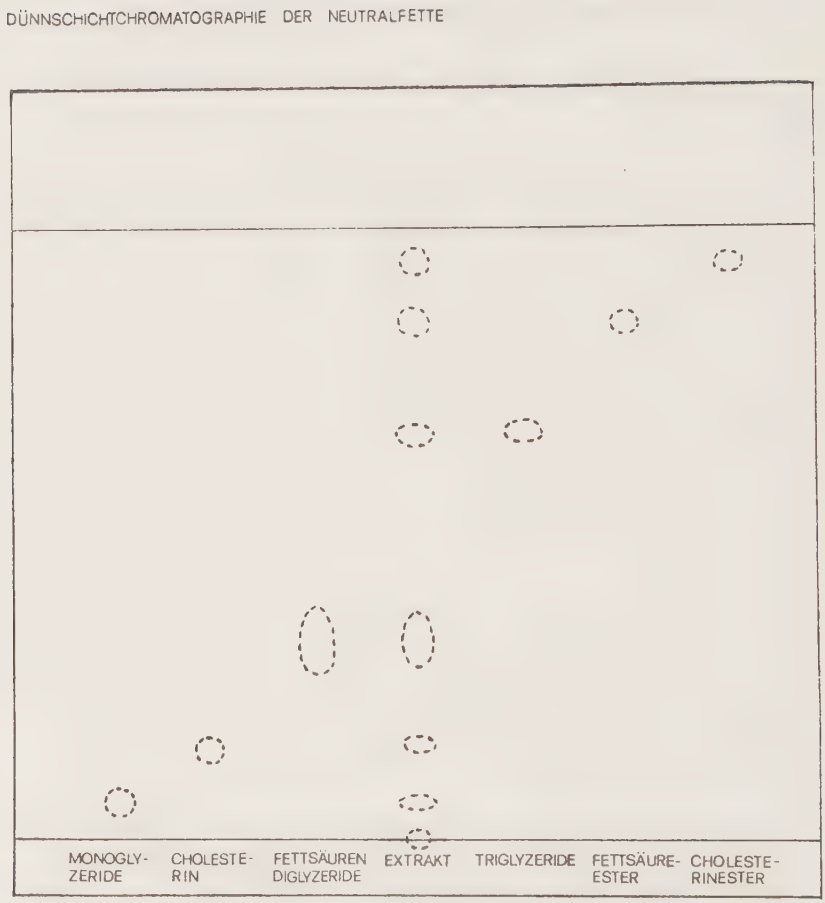


Abb. 11: Dünnschichtchromatogramm der Neutralfette der Bürstensaummembranen der Rattenniere

zufriedenstellend, wenn das jeweilige Laufmittel jeden Tag frisch angesetzt wird.

Zur Messung der radioaktiven Einbauraten wurden die mit Bleistift umrandeten Felder der Lipide ausgeschnitten, in Szintillationsgefäße überführt und mit je 10 ml Szintillationslösung 1 (Fa. Roth) überschichtet. Dann wurde zehn Minuten geschüttelt und nach zwei Stunden wurde die Radioaktivität mit einem Liquid Scintillation Counter gemessen. Alle Werte wurden zweimal je zehn Minuten bestimmt.

5.2.3. Ergebnisse

Wie aus der nachgestellten Tabelle 3 ersichtlich, sind die radioaktiven Einbauraten der verschiedenen Phospholipide unterschiedlich.Ebenfalls unterschiedlich ist das Verhältnis der Einbauraten in Abhängigkeit von der Zeit.
Hohe radioaktive Einbauraten sind bei Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zu erkennen.
Phosphatidylserin und -inosit, die sich dünnschichtchromatographisch schwer trennen, und deren Counts aus diesem Grund immer gemeinsam bestimmt werden, zeigen relativ kleine radioaktive Einbauraten.
Über das Verhalten in Abhängigkeit von der Zeit läßt sich bei Sphingomyelin keine eindeutige Aussage machen, da die Schwankungsbreite des Wertes bei 60 Minuten fast 50% beträgt.
Die Werte für Phosphatidylcholin sind die drei Stunden nahezu konstant.
Die radioaktive Markierung von Phosphatidylserin und -inosit steigt zwischen 60 und 120 Minuten an. Der Wert für 180 Minuten überschreitet den bei 120 Minuten gemessenen nicht wesentlich.

Phosphatidylethanolamin zeigt ebenfalls eine deutliche Veränderung der radioaktiven Einbauraten zwischen 60 und 120 Minuten. Zwischen dem ersten Wert bei 60 Minuten und dem zweiten bei 120 Minuten ist eine fallende Tendenz zu verzeichnen, die sich nicht weiter fortsetzt.

5.2.4. Besprechung der Ergebnisse

Die von Scherphof und van Deenen (26) gemachten Beobachtungen für die Leberzellmembranen können durch die Ergebnisse für die Bürstensaummembranen der Rattenniere nur bestätigt werden. Bei der Anwendung von 1-C^{14}-Palmitinsäure wurde auch ein bevorzugter Einbau in Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin festgestellt.
Der vermehrte Abbau des Phosphatidylethanolamin geht, wie aus den Ergebnissen unter Punkt 5.2.3. ersichtlich, mit einer gesteigerten Synthese des Phosphatidylserin einher. Wahrscheinlich wird ein kleiner Teil des Phosphatidylethanolamin durch Methylierung in Phosphatidylcholin umgewandelt, was jedoch aus den bisherigen Ergebnissen nicht deutlich zu erkennen ist. Man kann zwar einen kleinen Anstieg der radioaktiven Einbauraten bei Phosphatidylcholin erkennen, doch die Schwankungsbreiten der Ergebnisse lassen keine eindeutigen Aussagen zu.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden. Ebenso die Lieferanten der Versuchstiere

Tabelle 3: Die radioaktiven Einbauraten in Abhängigkeit von der Zeit in die Phospholipide der Bürstensaummembran der Rattenniere, nach Applikation von 1-C^{14}-Palmitinsäure (DPM/mg Protein)

Zeit (Min)	Sphingomyelin	Phosphatidylcholin	Phosphatidylserin Phosphatidylinosit	Phosphatidyl-ethanolamin
60	1209 ± 847	3430 ± 541	352 ± 197	1169 ± 227
120	1341 ± 228	1289 ± 16	629 ± 71	1289 ± 16
180	1707 ± 279	1343 ± 284	690 ± 158	1376 ± 172

Insgesamt wurden 5 Versuche mit je drei Ratten durchgeführt (n=15).

5.3. Brattleboro-Ratte

Als Versuchstiere für alle folgenden Versuche werden männliche Brattleboro-Ratten verwendet.
Diese Ratten-Mutante wurde 1961 von Valtin und Schroeder (28) in Brattleboro/Vermont, USA entdeckt.
Die Brattleboro-Ratte wird mit neurogenem Diabetes insipidus geboren. Dieses Merkmal wird autosomal rezessiv vererbt und befindet sich an einem einzelnen Gen-Locus (29).
Man unterscheidet drei Genotypen:

a) homozygote Brattleboro-Ratten
b) heterozygote Brattleboro-Ratten
c) normale Ratten vom Long-Evans-Typ (Ursprungsrasse der Brattleboro-Mutante).

Homozygote Brattleboro-Ratten sind kleiner als heterozygote oder normale Ratten. Sokol und Sise (30) vermuten, daß diese Ratten-Mutante einen Mangel an Wachstumshormon besitzt.
Die Hauptunterschiede zwischen den Genotypen zeigen sich jedoch im Wasserumsatz:
Bei homozygoten Brattleboro-Ratten wurde von Valtin, Sawyer und Sokol (31) eine tägliche Urinausscheidung von 70% des Körpergewichtes gemessen. Die Wasseraufnahme entsprach der Urinausscheidung. Bei normalen Ratten lag die Urinausscheidung und Wasseraufnahme bei nur 3% des Körpergewichtes. Die Werte der heterozygoten Brattleboro-Ratten lagen zwischen homozygoten Brattleboro-Ratten und normalen Ratten.
Eine Behandlung mit Antidiuretischem Hormon bewirkt die Konzentrierung des Harns durch Erhöhung der Permeabilität der harnseitigen Membranen gegenüber Wasser. Somit wird der erhöhte Wasserumsatz bei Brattleboro-Ratten weitgehend korrigiert (32).

Homozygote Brattleboro-Ratten sind nicht in der Lage ADH zu bilden. Diese Behauptung wird von Untersuchungen, die Möhring und Möhring (33) durchführten, belegt. Sie fanden, daß im Plasma von homozygoten Brattleboro-Ratten kein ADH nachweisbar war, während der ADH-spiegel bei heterozygoten Brattleboro-Ratten etwa auf der Hälfte des Spiegels normaler Ratten liegt.

5.3.1. Behandlung mit Antidiuretischem Hormon (ADH)

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten verwendet, davon waren zwei Drittel (24 Tiere) Brattleboro-Ratten (Long-Evans-Ratten mit heterozygot ererbten, neurogenem Diabetes insipidus) mit einem Körpergewicht von 230 -290 g und ein Drittel (12 Tiere) normale Ratten vom Long-Evans-Typ des gleichen Stammes und gleichen Alters mit einem Körpergewicht von 320 - 390 g.
Die Hälfte der Brattleboro-Ratten (12 Tiere) wurde täglich mit 0,1 ml Pitressin-Tannat (Suspension in Öl), entsprechend 500 mU ADH, durch subkutane Injektion (unter das Rückenfell) behandelt. Diese Dosiswerte wurden aus Arbeiten von Krieger und Liotta (34) und Bakker et al. (35) entnommen.
Entsprechend wurden die restlichen Tiere, 12 Brattleboro-Ratten und 12 normale Ratten täglich mit der gleichen Menge sterilem Sesamöl behandelt.
Die Injektionen wurden vierzehn Tage täglich zur gleichen Zeit verabreicht, die letzte Injektion einen Tag vor Tötung der Tiere.

5.3.2. Behandlungskontrolle

Als Parameter des Behandlungserfolges und zur Überprüfung des homozygoten Merkmales der Brattleboro-Ratten wurde die Wasseraufnahme der Tiere als Gewichtsverlust der Tränkflaschen über 24 Stunden gemessen.

Die aufgenommene Wassermenge pro 24 Stunden ist bei Brattleboro-Ratten um ein Vielfaches größer als bei normalen bzw. bei den mit ADH behandelten Brattleboro-Ratten, wie aus der folgenden Tabelle 4 ersichtlich ist.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden. Ebenso die Lieferanten der Versuchstiere.

Tabelle 4: Wasseraufnahme der Versuchstiere pro 24 Stunden

Versuchstiergruppe	Anzahl der Tiere	Durchschnittskörpergewicht (g)	Wasseraufnahme (ml/100 g in 24 Std.)
Brattleboro-Ratten	12	255,2 ± 32,5	60,5 ± 10,8
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	12	320,8 ± 38,5	12,1 ± 1,6
Normale Ratten	12	365,5 ± 26,3	10,9 ± 1,9

5.4. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide und Bestimmung der radioaktiven Einbauraten nach Injektion von 1-C^{14}-Palmitinsäure an Brattleboro-Ratten

Der unter Punkt 5.2. beschriebene Versuch wurde mit 12 Brattleboro-Ratten, mit 12 mit ADH behandelten Brattleboro-Ratten und mit 12 normalen Ratten durchgeführt.

5.4.1. Versuchsdurchführung

Von den in drei Gruppen eingeteilten Versuchstieren wurden pro Tag drei Tiere verwendet. Um möglichst gute Einzelergebnisse zu erzielen, wurden die Tiere nach einem Versuchsplan ausgesucht.
Den Tieren wurde eine an Humanalbumin gebundene 1-C^{14}-Palmitinsäure injiziert. Die spezifische Aktivität pro 100 µl betrug:

1,4 mCi/mMol
5,3 µCi/mg.

Wegen der unterschiedlichen Körpergewichte der verschiedenen Versuchstiergruppen, wurden pro 100 g Körpergewicht 100 µl (entsprechend 1,4 mCi/mMol) radioaktiv markierter Palmitinsäure injiziert.
Die Injektionen erfolgten zur Vermeidung von Stress und Arbeitsplatzkontamination unter Halothannarkose. Alle drei Tiere wurden zur gleichen Zeit getötet, die Nieren sofort entnommen und in eisgekühlten Puffer gelegt. Es folgte die Präparation der Bürstensaummembranen, die Extraktion der Lipide, die dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide und die Bestimmung der radioaktiven Einbauraten mittels Flüssigkeitsszintographie. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Punkt 5.2.2. beschrieben.

Versuchsplan (Teil 1):

Versuchstag	Versuchstiergruppe	Anzahl der Tiere	Tötung der Tiere x Stunden nach Injektion der Palmitinsäure
Tag 1	Brattleboro-Ratte	1	1 Stunde
	Brattleboro-Ratte mit ADH-Therapie	1	1 Stunde
	Normale Ratte	1	1 Stunde
Tag 2	Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	3	1 Stunde
			2 Stunden
			3 Stunden
Tag 3	Brattleboro-Ratte	1	2 Stunden
	Brattleboro-Ratte mit ADH-Therapie	1	2 Stunden
	Normale Ratte	1	2 Stunden
Tag 4	Brattleboro-Ratten	3	1 Stunde
			2 Stunden
			3 Stunden

Versuchsplan (Teil 2):

Versuchstag	Versuchstiergruppe	Anzahl der Tiere	Tötung der Tiere x Stunden nach Injektion der Palmitinsäure
Tag 5	Brattleboro-Ratte	1	3 Stunden
	Brattleboro-Ratte mit ADH-Therapie	1	3 Stunden
	Normale Ratte	1	3 Stunden
Tag 6			1 Stunde
	Normale Ratten	3	2 Stunden
			3 Stunden

Der siebte Versuchstag entspricht wieder dem ersten, der achte dem zweiten usw.

5.4.2. Ergebnisse

Die dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide und der Neutralfette war bei allen Versuchen einwandfrei.
Auch bei den Neutralfetten wurden die radioaktiven Einbauraten gemessen. Radioaktivität konnte nur bei den freien Fettsäuren gemessen werden, die jedoch bei allen drei Versuchstiergruppen gleich hoch war.
In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die radioaktiven Einbauraten in die Phospholipide der Bürstensaummembranen dargestellt.

5.4.3. Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, sind Unterschiede zwischen den Werten der Brattleboro-Ratten und den miteinander vergleichbaren Werten von Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und den normalen Ratten festzustellen. Für die Brattleboro-Ratten ist bei Sphingomyelin und Phosphatidylcholin folgendes Phänomen zu beobachten:
Die anfänglich hohen Einbauraten (bei 60 Minuten) erreichen bei 120 Minuten ein Minimum und steigen nach 180 Minuten wieder auf den Ausgangswert an.
Bei Phosphatidylethanolamin ist zwischen dem Wert von 60 Minuten und dem von 120 Minuten eine deutlich fallende Tendenz zu verzeichnen, die sich jedoch nicht weiter fortsetzt; der Wert für 180 Minuten entspricht dem von 120 Minuten.
In Phosphatidylserin und -inosit ist nach 60 Minuten kein meßbarer Einbau zu erkennen. Nach 120 Minuten ist eine geringe Radioaktivität meßbar, die weiter ansteigt.
Die mit ADH behandelten Brattleboro-Ratten und die normalen Ratten verhalten sich vergleichbar zueinander.

Die Einbauraten in Sphingomyelin sind durch die drei Stunden nahezu konstant.
Bei Phosphatidylcholin sind nach 60 Minuten hohe Einbauraten zu verzeichnen, die nach 120 Minuten ein Minimum durchlaufen und nach 180 Minuten wieder leicht ansteigen, jedoch bei weitem den Ausgangswert, wie es bei den Brattleboro-Ratten der Fall ist, nicht erreichen.
Bei Phosphatidylserin und -inosit ist schon nach 60 Minuten ein Einbau zu verzeichnen, der bis 120 Minuten ansteigt und sich dann nicht mehr verändert.
Die radioaktiven Einbauraten in Phosphatidylethanolamin zeigen eine fallende Tendenz, vor allem zwischen den Werten von 120 und 180 Minuten.
Den Ergebnissen liegen die radioaktiven Einbauraten in das entsprechende Phospholipid pro 1 mg Membranprotein zugrunde.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden. Ebenso die Lieferanten der Versuchstiere.

Tabelle 5: Die radioaktiven Einbauraten in Abhängigkeit von der Zeit in die Phospholipide der Bürstensaummembranen der Rattenniere, nach Applikation von 1-C^{14}-Palmitinsäure; n=12 (DPM/mg Protein)

Zeit	Versuchstiergruppe	Sphingomyelin	Phosphatidyl-cholin	Phosphatidyl-serin u. -inosit	Phosphatidyl-ethanolamin
60		2249 ± 220	3619 ± 174	----	1672 ± 152
120	Brattleboro-Ratten	1461 ± 125	2702 ± 13	258 ± 46	1096 ± 67
180		2271 ± 122	3408 ± 260	459 ± 61	1047 ± 87
60		1625 ± 170	5549 ± 180	385 ± 28	1831 ± 37
120	Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	1394 ± 102	2440 ± 190	646 ± 43	1804 ± 77
180		1298 ± 101	2638 ± 216	687 ± 67	1386 ± 116
60		1405 ± 155	5494 ± 144	367 ± 56	1912 ± 84
120	Normale Ratten	1314 ± 113	3494 ± 261	631 ± 21	1640 ± 20
180		1473 ± 120	3896 ± 298	694 ± 98	1472 ± 108

5.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Chromatographie mit flüssiger mobiler Phase geht auf die Arbeiten des russischen Botanikers Tswett (39) zurück.
Anfänglich wurde in Säulen chromatographiert, deren Durchmesser meistens über 1 cm lag (40 - 42). Diese Methode wurde zur qualitativen und quantitativen Analyse von Gemischen und auch zur präparativen Auftrennung eingesetzt. Die Strömung der mobilen Phase durch die Säulenpackung wurde durch die Schwerkraft bewirkt und gelegentlich durch hydrostatischen Druck beschleunigt. Trotzdem lag die Strömungsgeschwindigkeit unter 60 ml/h pro cm^2 Säulenquerschnitt. Der mittlere Durchmesser der Teilchen betrug 100 µm (oder größer). Die Trennleistung solcher Trennsäulen war nicht besonders gut, da die Säulen ständig mit Probenmaterial überladen wurden.
Von der Papier- und Dünnschichtchromatographie wurde die Säulenchromatographie weitgehend verdrängt.
Durch die Entwicklung empfindlicher Detektoren zum Nachweis der Probensubstanzen im Eluat der Trennsäule und durch die Übertragung von Erkenntnissen der Gaschromatographie auf die Flüssigkeitschromatographie (43) erhielt diese wieder neuen Aufschwung.
Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (auch "schnelle Flüssigkeitschromatographie" genannt), verwendet man dünne Trennsäulen mit 2 - 6 mm inneren Durchmesser. Die Säulen werden mit Teilchen gepackt, deren mittlerer Durchmesser unter 50 µm liegt. Die Geschwindigkeit der mobilen Phase wird durch einen hohen Eingangsdruck (10 - 400 at) beschleunigt. Im allgemeinen arbeitet man mit linearen Strömungsgeschwindigkeiten zwischen 0,1 und 5 cm/sec oder auch noch höher (44).

Flüssigkeitschromatographische Verfahren werden vornehmlich zur Trennung von nicht unzersetzt verdampfbaren Substanzen verwendet. Bei kleinen und unpolaren Molekülen spielt bei der Sorption die Konkurrenz der im großen Überschuß vorhandenen Lösungsmittelmoleküle eine Rolle, so daß die flüssigchromatographische Trennung unmöglich wird. Bei größeren Molekülen machen sich schon Ausschlußreaktionen bemerkbar. Die Flüssigchromatographie geht kontinuierlich in das Gebiet der Ausschlußchromatographie über, bei der die Trennung ausschließlich auf Unterschieden der Molekülgestalt beruht.
Mit der Einführung der HPLC haben sich neue Wege und Möglichkeiten für die Analytik der Phospholipide eröffnet. Die klinische Chemie hat als erste die HPLC zur Trennung der Phospholipide, aus Blut, Fruchtwasser und verschiedenen Geweben, eingesetzt (45 - 54).
Die dabei verwendeten stationären Phasen waren neben Kieselgel auch andere, modifizierte Trägermaterialien und selbst Ionenaustauscher (45 - 48). Bei der Wahl der mobilen Phase hingegen ist man durch die Detektionsart etwas eingeengt. Es werden vorwiegend UV-Detektoren eingesetzt, welche im ng- und µg-Bereich die nötige Empfindlichkeit besitzen und dabei jedoch relativ unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen und Veränderungen durch Gradienten sind.
Die UV-Detektion der Phospholipide erfolgt zwischen 203 und 206 nm. Die Absorption in diesem Bereich beruht auf der Anwesenheit von ungesättigten Verbindungen und funktionellen Gruppen. Sie wird als Endabsorption bezeichnet (47,48). Weil in der HPLC oft die mobile Phase, welche sich in der dünnschichtchromatographischen Trennung bewährte, ihre Anwendung fand, versuchte man für die Trennung der Phospholipide das Gemisch aus

Chloroform/Methanol/Wasser einzusetzen. Wegen der Eigenabsorption kann dies Phase jedoch nicht bei UV-Detektion verwendet werden. Als Ersatz wurde oft als mobile Phase n-Hexan/iso-Propanol/Wasser eingesetzt.

5.5.1. Qualitative und quantitative Bestimmung der Phospholipide der Bürstensaummembranen

Hax et al. (48) trennten 1977 die Phospholipide aus tierischem Gewebe. Als stationäre Phase diente eine Trennsäule von 25 cm Länge und 0,46 cm Durchmesser, die mit Whatman PXS 10/25 SCX 10 µm bestückt war. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril - Methanol - Wasser im Verhältnis 400:100:34 (v/v) verwendet. Die UV-Detektion lag bei 203 nm. Getrennt wurden Phosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Lysophosphatidylcholin.
Ebenfalls 1977 trennten Kiuchi et al. (51) aus tierischem Gewebe Phospholipide mit LiChrosorb Si60 10 µm als stationäre Phase und n-Hexan - iso-Propanol - Wasser, 6:8:1 (v/v), als mobile Phase. Die UV-Detektion erfolgte bei 206 nm.
Mit dieser Methode konnten die folgenden Phospholipide getrennt werden: Phosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Phosphatidylinosit und Lysophosphatidylcholin.
Mit u-Poasil als stationäre Phase und Acetonitril - Methanol - Wasser, 50:45:6,5 (v/v), als mobile Phase und einem Phosphordetektor, trennten Hanson et al. (53) die Phospholipide aus tierischem Gewebe. Es wurden Phosphatidylinosit, Phosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin

und Lysophosphatidylcholin nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die qualitative und quantitative Bestimmung der Phospholipide der Bürstensaummembranen nach Chen und Kou (55) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel, als mobile Phase ein Gemisch aus Acetonitril - Methanol - Phosphorsäure, 130:5:1,5 (v/v), verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 203 nm.
Nachgewiesen werden konnten: Phosphatidylinosit, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin. Die Trennung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 ml/min.

5.5.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden wieder 24 männliche Brattleboro-Ratten und 12 normale Ratten des Long-Evans-Typ verwendet. Sie wurden wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben in drei Gruppen eingeteilt und mit ADH bzw. sterilem Sesamöl behandelt.

5.5.3. Versuchsdurchführung

Von den in drei Gruppen eingeteilten Versuchstieren wurden pro Tag drei Tiere verwendet. Die Auswahl der Tiere erfolgte nach dem, unter Punkt 5.4.1. beschriebenen Versuchsplan.
Den Tieren wurde eine, an Humanalbumin gebundene Palmitinsäure injiziert, pro 100 g Körpergewicht 100 µl. Die Applikationen erfolgten zur Vermeidung von Stress unter Halothannarkose.
Alle drei Tiere wurden zur gleichen Zeit getötet, die Nieren sofort entnommen und in eiskalten Puffer (Mannit/Tris) gelegt. Nach zehn Minuten erfolgte die Präparation der Bürstensaummembranen (nach Punkt 3.4.)

und anschließend die Extraktion der Lipide (nach Punkt 3.5.).
Nach erfolgter Extraktion wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff verdampft und der Rückstand in 250 µl Extraktionsgemisch (Chloroform - Methanol, 2:1) aufgenommen.
Zur Bestimmung der Phospholipide wurde das folgende Gerätesystem verwendet:
Waters Wisp 710 A als Probengeber, einen variablen Wellenlängen-Detektor der Fa. Latek (Spectro Monitor III) und ein Hewlett Packard Integrator.
Als Säule wurde eine Hibar Fertigsäule der Fa. Merck, deren Trägermaterial aus LiChrosorb Si60 10 µm bestand, eingesetzt. Die mobile Phase setzte sich aus Acetonitril - Methanol - 85%iger Phosphorsäure, 130:5:1,5 (v/v) zusammen.

Die chromatographischen Bedingungen waren für alle Proben gleich.

UV-Detektion	203 nm	
Empfindlichkeit	0,5 A.U.F.S.	
Strömungsgeschwindigkeit	1 ml/min	
Injektionsvolumen	7 µl	
Papiergeschwindigkeit	0,0 - 2,7 min	0,0 cm/min
	2,7 - 10,0 min	0,4 cm/min
	10,0 - 18,5 min	0,3 cm/min
	18,5 - 30,0 min	0,2 cm/min
Attenuation	0,0 - 6,0 min	2^2
	6,0 - 10,0 min	2^3
	10,0 - 30,0 min	2^2

Die nachfolgenden HPLC-Chromatogramme sollen einen kleinen Überblick zur Trennung der Phospholipide der Bürstensaummembranen geben.

RUN # 30 JAN/30/83 03:06:09

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.31	159720	VV	1R	319440.000
3.83	73873	VV	2	0.000
4.19	152790	VB	3	0.000
8.22	976990	PB	4	0.000
12.67	834310	BB	5	0.000
18.42	1299	PB	7	0.000
21.77	973460	BV	8	0.000
25.35	883250	VP	9	0.000

TOTAL AREA= [illegible]
MUL FACTOR= [illegible]

Abb. 12: Probe vom 14.1.83
mit ADH behandelte Brattleboro-Ratte 1 Stunde
nach Injektion der Palmitinsäure

RUN # 24 JAN/29/83 23:54:48

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.24	12673	BP	1R	25346.000
3.77	15969	PV	2	0.000
4.11	69025	VB	3	0.000
8.13	910850	PB	4	0.000
12.56	785410	PB	5	0.000
18.17	7134	PB	7	0.000
21.57	531540	BV	8	0.000
25.26	539690	VP	9	0.000

TOTAL AREA= [illegible]
MUL FACTOR= [illegible]

Abb. 13: Probe vom 20.1.83
mit ADH behandelte Brattleboro-Ratte 2 Stunden
nach Injektion der Palmitinsäure

RUN # 27 JAN/30/83 01:30:01

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.26	20588	BV	1R	41176.000
3.76	24887	VV	2	0.000
4.11	33241	VB	3	0.000
8.11	983180	BB	4	0.000
12.51	8146000	BB	5	0.000
18.14	15	PB	7	0.000
21.48	796700	BV	8	0.000
25.03	736040	VP	9	0.000

TOTAL AREA= 10749348
MUL FACTOR= 1.0000E+000

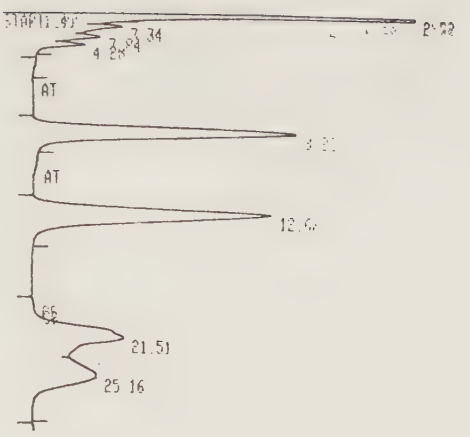
Abb. 14: Probe vom 19.1.83
mit ADH behandelte Brattleboro-Ratte 3 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure

RUN # 32 JAN/30/83 04:10:02

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.34	173970	VV	1R	3479500.000
3.86	103000	VV	2	0.000
4.21	47358	VB	3	0.000
8.25	1090500	PB	4	0.000
12.69	987010	BB	5	0.000
21.75	1108200	BV	8	0.000
25.28	941430	VP	9	0.000

TOTAL AREA= 4951508
MUL FACTOR= 1.0000E+000

Abb. 15: Probe vom 13.1.83
Brattleboro-Ratte 1 Stunde nach Injektion der Palmitinsäure



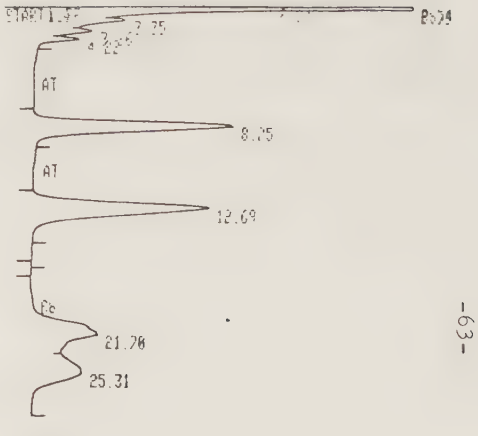
RUN # 39 JAN/30/83 02:53:27

ESTD

RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.34	25653	BV	1R	51306.000
3.84	26909	VP	2	0.000
4.20	17045	PB	3	0.000
8.22	1187100	PB	4	0.000
12.62	1053400	BB	5	0.000
21.51	1030000	BV	8	0.000
25.16	835840	VB	9	0.000

TOTAL AREA= 4176000
MUL FACTOR= 1.0000E+00

Abb. 17: Probe vom 17.1.83
Brattleboro-Ratte 3 Stunden nach Injektion
der Palmitinsäure



RUN # 35 JAN/30/83 05:45:33

ESTD

RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.35	159190	VV	1R	318380.000
3.86	80402	VV	2	0.000
4.22	49605	VB	3	0.000
8.25	906640	PB	4	0.000
12.69	791360	BB	5	0.000
21.70	709360	PV	8	0.000
25.31	670[illegible]50	VB	9	0.000

TOTAL [illegible]
MUL [illegible]

Abb. 16: Probe vom 15.1.83
Brattleboro-Ratte 2 Stunden nach Injektion
der Palmitinsäure

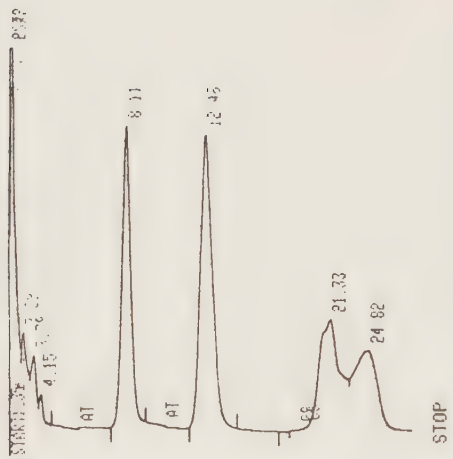


Abb. 18: Probe vom 14.1.83
normale Ratte 1 Stunde nach Injektion
der Palmitinsäure

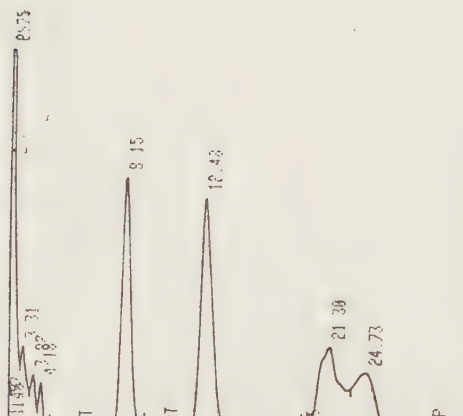
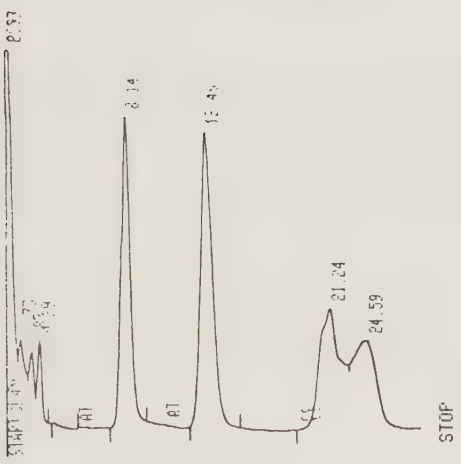


Abb. 19: Probe vom 17.1.83
normale Ratte 2 Stunden nach Injektion
der Palmitinsäure

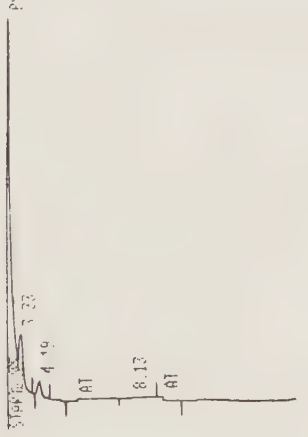


RUN # 50 JAN/30/83 13:38:26

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.33	151580	VV	1R	302160.000
3.83	102450	VV	2	0.000
4.20	94510	VB	3	0.000
8.14	1421400	PB	4	0.000
12.46	1297700	BB	5	0.000
21.24	1375800	BV	6	0.000
24.59	1235000	I VH	9	0.000

TOTAL [illegible]
MUL F [illegible]

Abb. 20: Probe vom 18.1.83
normale Ratte 3 Stunden nach Injektion
der Palmitinsäure



RUN # 53 JAN/30/83 15:12:31

ESTD RT	AREA	TYPE	CAL#	AMOUNT
3.33	12793	BB	1R	25586.000
4.19	12908	BB	2	0.000
8.13	6521	PB	4	0.000

TOTAL AREA= 32222
MUL FACTOR= 1.0000E+00

Abb. 21: HPLC-Chromatogramm des Lösungsmittelgemisches

Für die Abbildungen 12 bis 20 wurde je ein HPLC-Chromatogramm einer Probe stellvertretend für vier Proben herausgegriffen.
Die Abb. 21 stellt das HPLC-Chromatogramm des Lösungsmittelgemisches dar.
Die Peaks bei 3,3 und 4,1 Minuten sind durch das Lösungsmittel bedingt.
Zwischen diesen Lösungsmittelpeaks liegt Phosphatidylinosit, bei 3,7 Minuten. Diese Tatsache muß bei der Auswertung und Betrachtung der Werte berücksichtigt werden. Es folgen, nach 8,1 - 8,2 Minuten Phosphatidylserin, nach 12,5 - 12,6 Minuten Phosphatidylethanolamin und nach 25,2 - 25,3 Minuten Sphingomyelin.

5.5.4. Ergebnisse

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Phospholipide der Bürstensaummembranen zusammengefasst. Mit den Fig. 1 bis 4 werden die einzelnen Phospholipide graphisch dargestellt.

5.5.5. Besprechung der Ergebnisse

Das Phosphatidylinosit der Brattleboro-Ratten zeigt keine Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Zeit. Anders ist es bei Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin. Hier verringern sich die Konzentrationen dieser Phospholipide zwischen der ersten und zweiten Stunde nach der Injektion der Palmitinsäure, bleiben dann jedoch konstant. Der Gehalt an Phosphatidylcholin in den Bürstensaummembranen der Niere von Brattleboro-Ratten nimmt zwischen der ersten und zweiten Stunde stärker ab, als zwischen der zweiten und dritten Stunde nach der Applikation der Fettsäure.

Die Konzentrationen der Phospholipide der Bürstensaummembranen aus den Nieren von Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie, nehmen um fast 50%, bei Phosphatidylinosit um 75% des Wertes der ersten Stunde nach der Injektion der Palmitinsäure, ab.

Bei normalen Ratten konnten keine merklichen Konzentrationsänderungen der Phospholipide in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden. Ebenso die Liefernaten der Versuchstiere.

Tabelle 6: Quantitative Bestimmung der Phospholipide der Bürstensaummembranen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Versuchstiergruppe	x Stunden nach Injektion der Palmitinsäure	Phosphatidyl-inosit (µg)	Phosphatidyl-serin (mg)	Phosphatidyl-ethanolamin (mg)	Phosphatidyl-cholin (mg)
Brattleboro-Ratten	1 Stunde	115,7 ± 11,7	5,9 ± 0,5	3,2 ± 0,3	13,8 ± 0,9
	2 Stunden	119,9 ± 7,7	4,5 ± 0,4	2,5 ± 0,2	11,7 ± 1,0
	3 Stunden	112,0 ± 10,2	4,2 ± 0,4	2,5 ± 0,2	10,3 ± 0,9
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	1 Stunde	208,2 ± 15,2	6,2 ± 0,5	3,4 ± 0,3	15,5 ± 1,1
	2 Stunden	138,4 ± 12,1	4,4 ± 0,3	2,9 ± 0,3	8,4 ± 0,8
	3 Stunden	50,4 ± 4,9	3,6 ± 0,2	1,9 ± 0,2	7,4 ± 0,6
Normale Ratten	1 Stunde	123,4 ± 11,1	5,4 ± 0,4	3,1 ± 0,3	11,8 ± 0,9
	2 Stunden	100,5 ± 9,8	4,9 ± 0,4	2,8 ± 0,3	11,2 ± 1,0
	3 Stunden	100,8 ± 9,1	5,1 ± 0,5	3,0 ± 0,2	12,1 ± 0,9

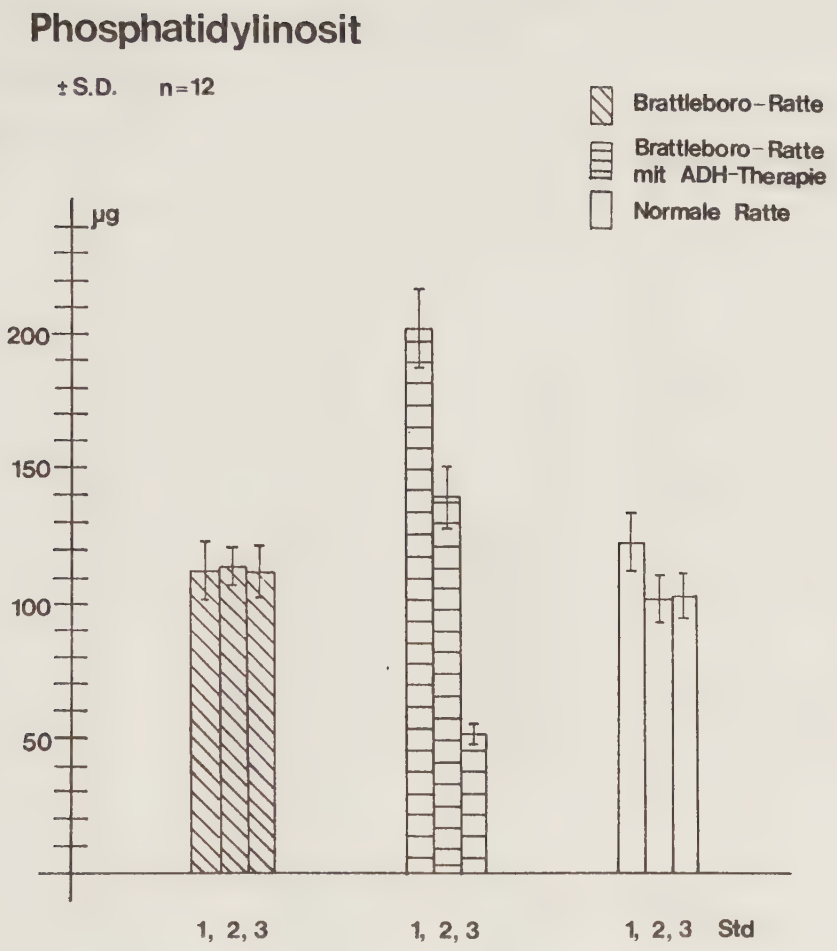


Fig. 1: Die quantitative Bestimmung des Phosphatidylinosit in den Bürstensaummembranen der Rattennieren (µg)

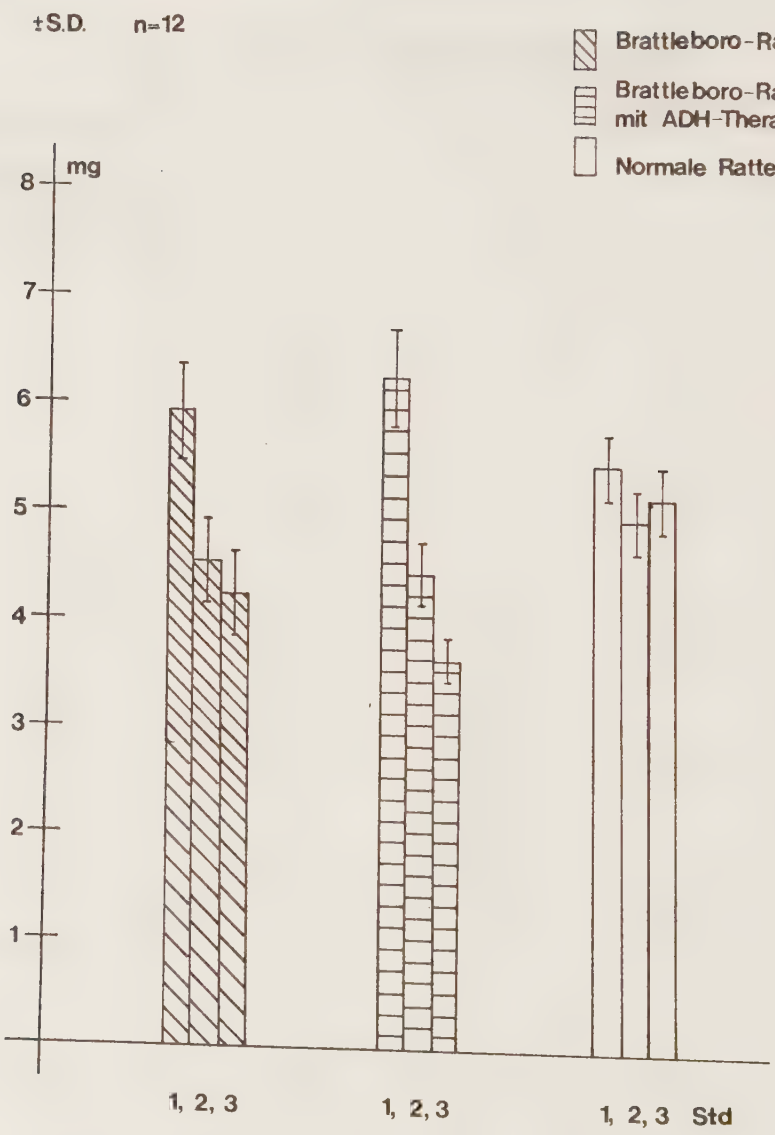


Fig. 2: Die quantitative Bestimmung des Phosphatidylserin in den Bürstensaummembranen der Rattennieren (mg)

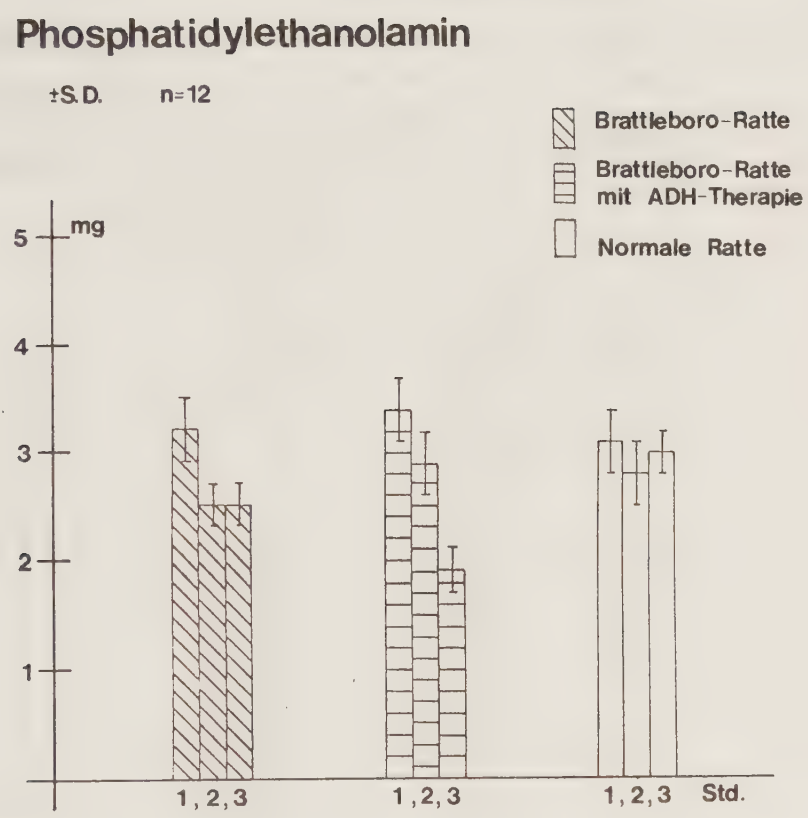


Fig. 3: Die quantitative Bestimmung des Phosphatidyl-
ethanolamin in den Bürstensaummembranen der
Rattennieren (mg)

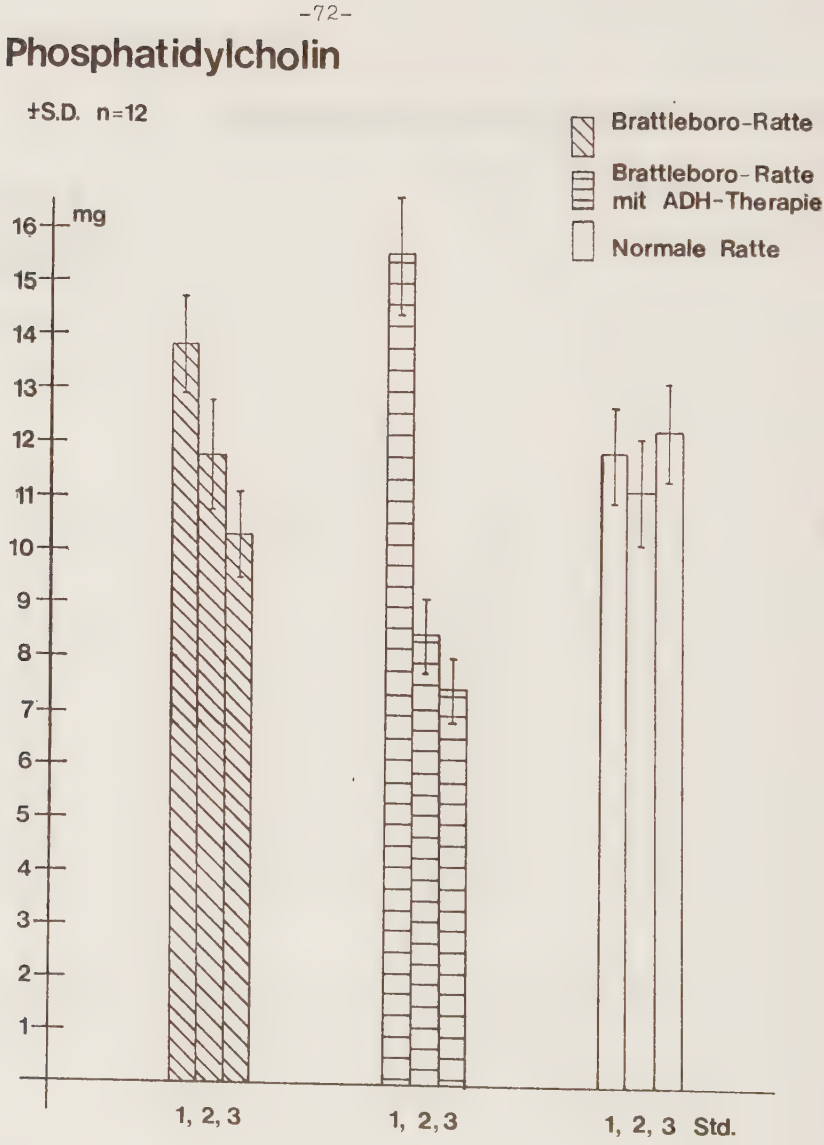


Fig. 4: Die quantitative Bestimmung des Phosphatidylcholin in den Bürstensaummembranen der Rattennieren (mg)

5.6. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie dient zur Trennung von Gasgemischen oder flüssigen Mischungen, die vorher restlos verdampft werden. Als stationäre Phase verwendet man bei der Gas-Festkörper-Chromatographie, die man auch als Gas-Adsorptions-Chromatographie bezeichnet, ein Adsorptionsmittel wie z.B. Aktivkohle, Silikagel, Tonerde, Zeolithe oder ähnliche Materialien.
Bei der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (Gas-Verteilungs-Chromatographie) ist die Trennsäule mit einem festen inerten Trägermaterial gefüllt, das mit einer hochsiedenden Flüssigkeit (Silikonöle, Trikresylphosphat, höhere Paraffine, Phtalsäureester usw.) imprägniert wird.
Die Trennsäulen sind spiral- oder U-förmige Rohre aus Glas, Kupfer, V2A-Stahl usw., wobei sich die Länge und der Durchmesser nach der Verwendung richten.
Das zu trennende Stoffgemisch wird als Gas oder Dampf auf die Trennsäule gegeben. Gleichzeitig leitet man bei konstantem Druck ein völlig gleichmäßig strömendes Trägergas durch die Säule. Hierzu eignet sich Wasserstoff,Stickstoff, Kohlendioxid, Helium oder Argon.
An die Stelle des Lösungsmittelgemisches bei der Dünnschichtchromatographie tritt hier gleichsam das Gas. Entsprechend ihrer Adsorption bzw. Verteilung und ihrer Wanderungsgeschwindigkeit werden die Komponenten der Mischung getrennt. Nach Verlassen der Säule leitet man die Gasmischung durch einen Detektor, der mit einem Schreiber verbunden ist. Der Detektor mißt eine physikalische Größe, die sich linear mit der Konzentration des betreffenden Stoffes ändert. Am verbreitetesten ist die Messung der Wärmeleitfähigkeit und der Flammenionisation. Daneben können noch die Gasdichte, die Verbrennungswärme, die radioaktive

Ionisation, die Dielektrizitätskonstante und andere Größen verwendet werden.
Die erhaltenen Gaschromatogramme können qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

5.6.1. Bestimmung der an den Phospholipiden sitzenden Fettsäuren mittels Gaschromatographie

Nach einer von van Deenen (3) aufgestellten These beeinflußt die Struktur der Kohlenwasserstoffketten die Permeabilitätseigenschaften natürlicher und künstlicher Membranen. Infolge der weniger dichten Packung ungesättigter Phospholipide in Grenzschichten sind die Barrieren durchlässiger als solche mit gesättigten Phospholipiden.
Die angewandte Methode umfaßt die Extraktion der Lipide, die dünnschichtchromatographische Auftrennung und die qualitative und quantitative gaschromatographische Analyse der veresterten Fettsäuren nach der Umesterung zu den 2-Methoxyethylestern.

5.6.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden wieder 24 männliche Brattleboro-Ratten und 12 normale Ratten des Long-Evans-Typ verwendet. Sie wurden wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben in drei Gruppen eingeteilt und mit ADH bzw. sterilem Sesamöl behandelt.

5.6.3. Versuchsdurchführung

Von den in drei Gruppen eingeteilten Versuchstieren wurden pro Tag drei Tiere verwendet. Die Auswahl der Tiere erfolgte nach dem, unter Punkt 5.4.1. beschriebenen Versuchsplan.
Den Tieren wurde eine, an Humanalbumin gebundene

Palmitinsäure injiziert, pro 100 g Körpergewicht 100 µl. Die Applikationen erfolgten zur Vermeidung von Stress unter Halothannarkose.
Alle drei Tiere wurden zur gleichen Zeit getötet, die Nieren sofort entnommen und in eiskalten Puffer (Mannit/Tris) gelegt. Nach zehn Minuten erfolgte die Präparation der Bürstensaummembranen (nach Punkt 3.4.) und anschließend die Extraktion der Lipide (nach Punkt 3.5.). Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff verdampft und der Rückstand in 250 µl Extraktionsgemisch (Chloroform-Methanol, 2:1, v/v) aufgenommen.
Die Lipide wurden wie unter Punkt 5.2.2. beschrieben dünnschichtchromatographisch getrennt.
Zur Umesterung wurde die Kieselgelschicht, die das Phospholipid enthält, in ein 10 ml Reagenzglas (mit Schraubkappe und Dichtungsring) gebracht. Nach der Zugabe von 100 µl Pentadecansäure-Standardlösung (0,0825 mMol Pentadecansäure in 100 ml 2-Methoxyethanol), 3 ml 2-Methoxyethanol und 1 ml Bortrifluorid-Diethylether-Komplex und einigen Perlen Molekularsieb, setzt man das Steigrohr auf und erwärmt im Paraffinbad 20 Minuten auf 110°C. Man kühlt sofort auf 0°C ab, fügt 5 ml dest. Wasser zu, schüttelt kräftig und läßt die Suspension in 7 ml gesättigte wäßrige Natriumhydrogencarbonatlösung einfließen. Anschließend schüttelt man mit 10 ml Petrolether aus. Die Oberphase wird abgetrennt und zur vollständigen Entfernung des Kieselgels zwei Mal mit 3 ml wäßriger Natriumchloridlösung 0,1 Mol/l gewaschen. Man vereinigt die Unterphasen und wiederholt die Extraktion. Die vereinigten Oberphasen werden auf 0,1 ml eingeengt (56).
Für die gaschromatographische Analyse wurde der Gaschromatograph 5840 A der Fa. Hewlett-Packard verwendet.

Gaschromatographische Bedingungen:

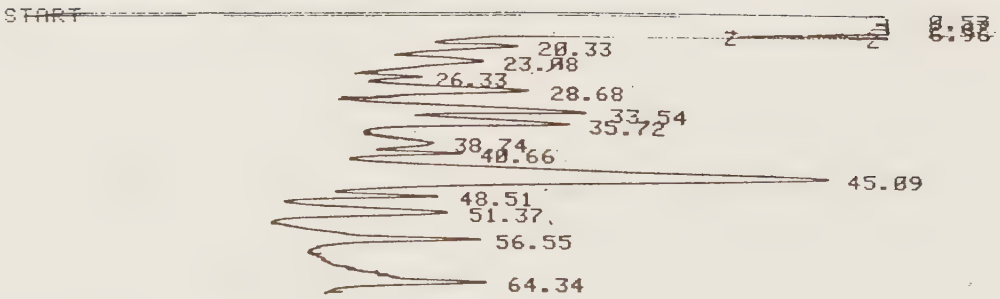
Säule: 2,4 m x 3,0 mm i.D. silanisiertes Glas
10% Silar 10 C, 80 - 100 mesh Gas Chrom Q

Trägergas	Helium
Detektor	FID (Temp. 260°C)
Einspritzblock	240°C
Temperaturprogramm	155 - 230°C
Integrator:	
Papiergeschwindigkeit	0,10 cm/min
Attenuation	2^1
Slope sensitivity	0,02
Temperaturprogramm:	
Anfangstemperatur	155°C 8,3 min isotherm
	155 - 184°C 4°C/min
	184 - 230°C 1°C/min
Einspritzvolumen:	5 µl

Die folgenden Gaschromatogramme zeigen die Fettsäurezusammensetzungen der verschiedenen Phospholipide, die aus den Bürstensaummembranen der Nieren von Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten isoliert wurden, nach Injektion einer an Humanalbumin gebundenen Palmitinsäure.

Abb. 22: Gaschromatogramm des Extraktionsgemisches (Leerwert)

Abb. 22: Gaschromatogramm des Extraktionsgemsiches (Leerwert)

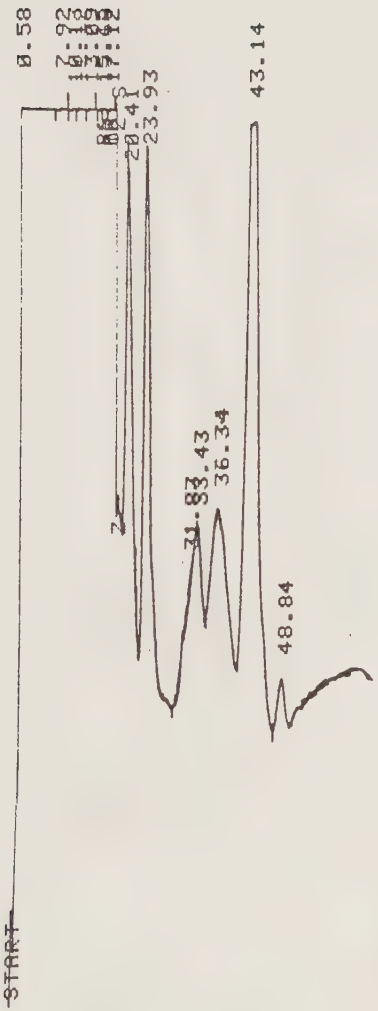


HP RUN # 275
AREA %

RT	AREA	AREA %
16.96	10840	11.244
23.08	3362	3.487
26.33	981	1.018
28.68	6253	6.486
30.98	2856	2.962
33.54	1805	1.872
35.72	11190	11.607
38.74	5757	5.972
40.66	3523	3.654
45.09	30520	31.657
48.51	2652	2.751
51.37	5294	5.491
56.55	5851	6.069
64.34	5524	5.730

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 23: Gaschromatogramm des Standards

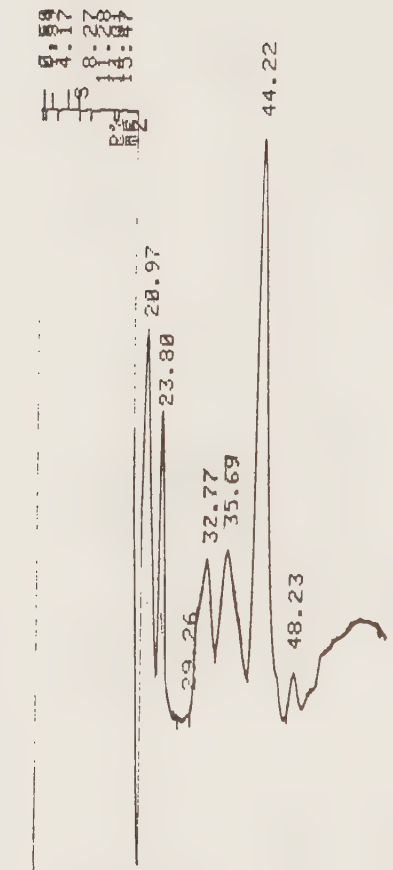


HP RUN # 237
AREA %

RT	AREA	AREA %
16.53	23560	22.001
23.06	16700	15.595
31.83	3410	3.184
33.43	8203	7.665
36.34	16020	14.960
43.14	33930	31.685
48.84	1420	1.326

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 24: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Sphingomyelin

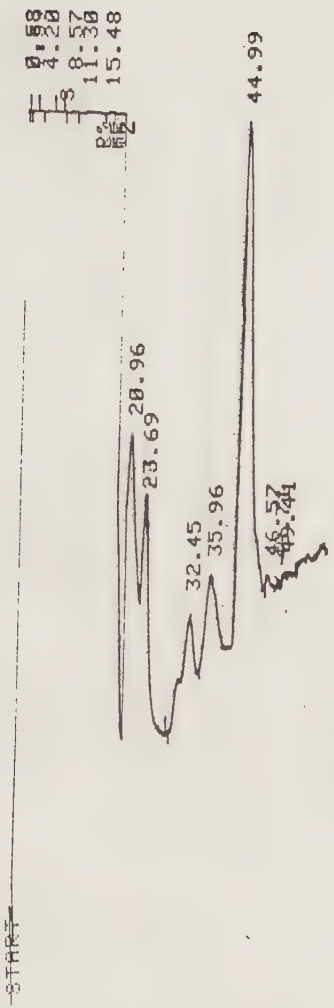


HP RUN # 239
AREA %

RT	AREA	AREA %
20.97	11960	15.657
23.80	8948	11.714
32.77	9040	11.835
35.69	12570	16.456
44.22	27700	36.263
48.23	1200	1.571

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 25: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylcholin

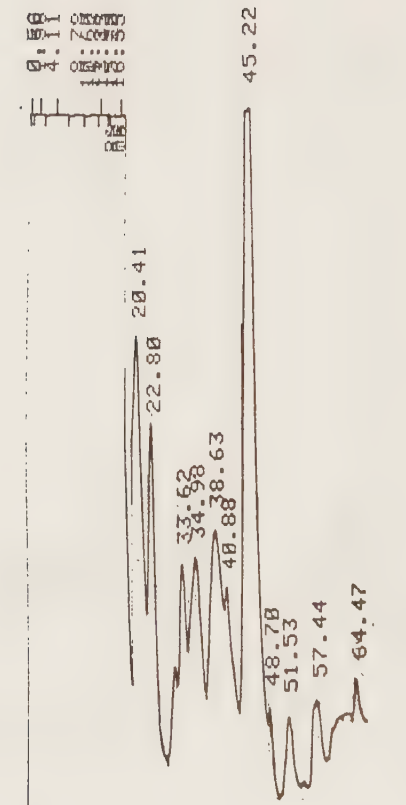


HP RUN # 174
AREA %

RT	AREA	AREA %
20.96	2479	2.555
23.69	1394	1.437
32.45	6373	6.569
35.96	9902	10.206
44.99	45860	47.270
46.57	6478	6.677
48.71	1668	1.719
49.41	2404	2.478

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 26: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylinosit und -serin (Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie u. normale Ratten)

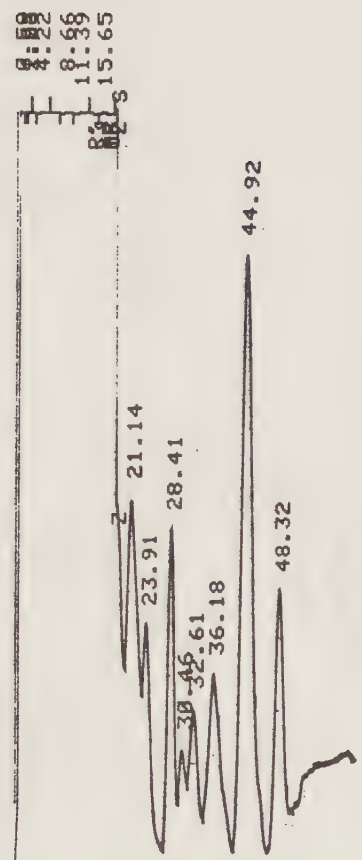


HP RUN # 260
AREA %

RT	AREA	AREA %
20.41	23020	20.424
22.80	2338	2.074
33.62	2542	2.255
34.98	10990	9.750
38.63	12650	11.223
40.88	6564	5.824
45.22	36220	32.135
48.78	1568	1.391
51.53	2162	5.739
57.44	3190	2.830
64.47	1295	1.149

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 27: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylinosit und -serin (Brattleboro-Ratten)

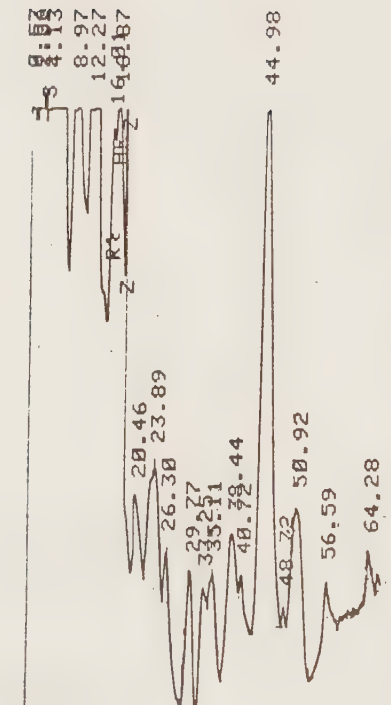


HP RUN # 172
AREA %

RT	AREA	AREA %
21.14	6862	9.347
23.91	3322	4.525
28.41	8062	10.982
30.46	2596	3.536
32.61	4803	6.542
36.18	8886	12.104
44.92	25800	35.143
48.32	7066	9.625

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0

Abb. 28: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylethanolamin (Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normale Ratten)



HP RUN # 268
AREA %

RT	AREA	AREA %
16.87	3462	2.542
23.89	6171	1.854
26.30	2443	0.734
29.77	3525	1.059
33.25	2553	0.767
35.11	5478	1.645
38.44	7460	2.241
40.72	4285	1.287
44.98	31540	9.473
48.72	1790	0.538
50.92	9020	2.709
56.59	7932	2.382
64.28	2693	0.809

Abb. 29: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylethanolamin (Brattleboro-Ratten)

Abb. 23: Gaschromatogramm des Standards

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.33	Pentadecansäure	(C-15)
23.08	Palmitinsäure	(C-16)
26.33	Palmitoleinsäure	(C-16:1)
33.54	Stearinsäure	(C-18)
35.72	Ölsäure	(C-18:1)
38.74	Linolsäure	(C-18:2)
40.66	Linolensäure	(C-18:3)
48.51	Arachinsäure	(C-20)
51.37	cis-11-Eicosensäure	(C-20:1)
56.55	Behensäure	(C-22)
64.34	Erucasäure	(C-22:1)

Abb. 24: Gaschromatogramm der Fettsäuren des Sphingomyelin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.41	Pentadecansäure	(C-15)
23.93	Palmitinsäure	(C-16)
33.43	Stearinsäure	(C-18)
36.34	Ölsäure	(C-18:1)
48.84	Arachinsäure	(C-20)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für alle drei Versuchstiergruppen 1,2 und 3 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure ausgewählt.

Abb. 25: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylcholin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.97	Pentadecansäure	(C-15)
23.80	Palmitinsäure	(C-16)
32.77	Stearinsäure	(C-18)

35.69	Ölsäure	(C-18:1)
48.23	Arachinsäure	(C-20)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für alle drei Versuchstiergruppen,1,2 und 3 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure,ausgewählt.

Abb. 26: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylinosit und -serin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.96	Pentadecansäure	(C-15)
23.69	Palmitinsäure	(C-16)
32.45	Stearinsäure	(C-18)
35.96	Ölsäure	(C-18:1)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für die Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normale Ratten, 1,2 und 3 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure, ausgewählt.

Abb. 27: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylinosit und -serin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.41	Pentadecansäure	(C-15)
22.80	Palmitinsäure	(C-16)
33.62	Stearinsäure	(C-18)
34.98	Ölsäure	(C-18:1)
38.63	Linolsäure	(C-18:2)
40.88	Linolensäure	(C-18:3)
48.70	Arachinsäure	(C-20)
51.53	cis-11-Eicosensäure	(C-20:1)
57.44	Behensäure	(C-22)
64.47	Erucasäure	(C-22:1)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für die Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten, 2 Stunden nach

der Injektion der Palmitinsäure, ausgewählt.

Abb. 28: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylethanolamin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
21.14	Pentadecansäure	(C-15)
23.91	Palmitinsäure	(C-16)
32.61	Stearinsäure	(C-18)
36.18	Ölsäure	(C-18:1)
48.32	Arachinsäure	(C-20)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für die Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normale Ratten, 1,2 und 3 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure, ausgewählt.

Abb. 29: Gaschromatogramm der Fettsäuren von Phosphatidylethanolamin

Retentionszeit	dazugehörige Fettsäure	
20.46	Pentadecansäure	(C-15)
23.86	Palmitinsäure	(C-16)
26.30	Palmitoleinsäure	(C-16:1)
33.25	Stearinsäure	(C-18)
35.11	Ölsäure	(C-18:1)
38.44	Linolsäure	(C-18:2)
40.72	Linolensäure	(C-18:3)
48.72	Arachinsäure	(C-20)
50.92	cis-11-Eicosensäure	(C-20:1)
56.59	Behensäure	(C-22)
64.28	Erucasäure	(C-22:1)

Dieses Chromatogramm wurde stellvertretend für die Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten, 1 und 2 Stunden nach Injektion der Palmitinsäure, ausgewählt.

5.6.4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse sind in den Figuren 5 bis 8 graphisch und in den Tabellen 7 bis 10 numerisch dargestellt.

5.6.5. Besprechung der Ergebnisse

Die gaschromatographische Analyse der Phospholipide der Bürstensaummembranen wurde unter der folgenden Fragestellung durchgeführt:
Erhöht sich der Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei Membranen im hochdurchlässigen Zustand. Als Membranen im hochdurchlässigen Zustand kann man die Bürstensaummembranen aus den Nieren von Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normale Ratten bezeichnen. Im nahezu undurchlässigen Zustand sind die Bürstensaummembranen aus den Nieren von Brattleboro-Ratten.
Im allgemeinen ist der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden 50%, d.h. die Phospholipide enthalten eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure pro Molekül (3).
Diese Tatsache konnte durch den vorangegangenen Versuch bestätigt werden. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinosit und -serin, und Phosphatidyl-ethanolamin lag bei normalen Ratten und bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie zwischen 50 und 60%, demzufolge enthalten diese Phospholipide eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure pro Molekül.

Bei den Brattleboro-Ratten zeigt sich folgendes Phänomen:
Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren steigt bei den

Phospholipiden Phosphatidylinosit und -serin zwei Stunden nach Injektion der Palmitinsäure auf 91,2% an, d.h. die Phospholipide enthalten fast ausschließlich ungesättigte Fettsäuren.
Leider konnten Phosphatidylinosit und -serin mit der angewandten dünnschichtchromatographischen Methode nicht getrennt werden. Aus diesem Grund werden diese beiden Phospholipide immer gemeinsam betrachtet.

Phosphatidylethanolamin zeigt in den ersten beiden Stunden nach der Applikation der Palmitinsäure einen Anteil an ungesättigten Fettsäuren von 92,3 bzw. 87,7%.

Bei Sphingomyelin und Phosphatidylcholin liegt der Anteil an ungesättigten Fettsäuren um 50%. Die Fettsäurezusammensetzung dieser beiden Substanzen entspricht der bei normalen Ratten und Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie gefundenen.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden. Ebenso die Lieferanten der Versuchstiere.

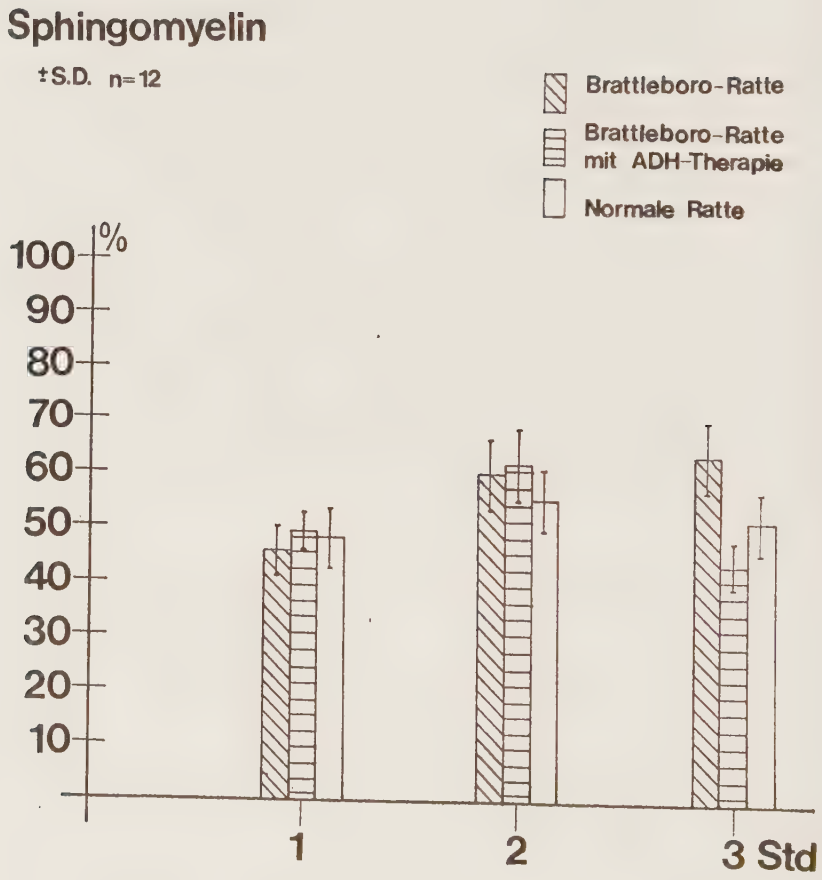


Fig. 5: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Sphingomyelin der Bürstensaummembranen

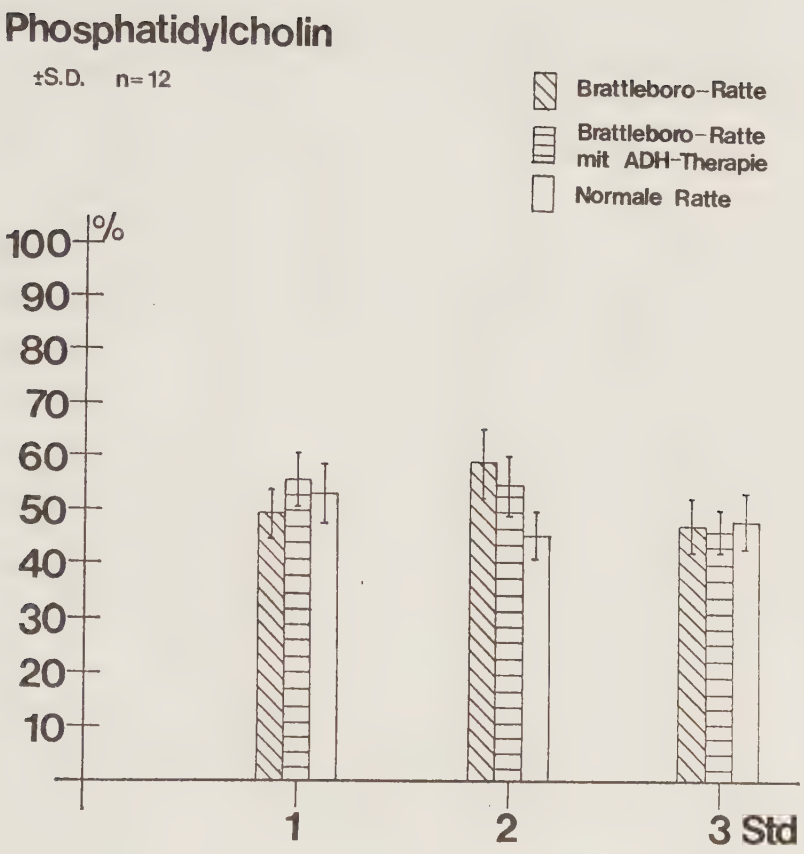


Fig. 6: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidylcholin der Bürstensaummembranen

Tabelle 7: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Sphingomyelin der Bürstensaummembranen der Rattenniere (n=12)

Versuchstiergruppe	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden
	nach der Injektion von Palmitinsäure		
Brattleboro-Ratten	46,0 ± 4,7	60,4 ± 6,3	64,3 ± 6,4
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	49,5 ± 3,8	62,1 ± 6,8	43,9 ± 4,3
Normale Ratten	48,3 ± 5,5	55,8 ± 5,7	52,1 ± 5,4

Tabelle 8: Der Abteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidylcholin der Bürstensaummembranen der Rattenniere (n=12)

Versuchstiergruppe	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden
	nach der Injektion der Palmitinsäure		
Brattleboro-Ratten	49,5 ± 4,8	59,2 ± 6,2	47,3 ± 5,0
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	55,8 ± 4,9	55,0 ± 5,7	46,7 ± 4,0
Normale Ratten	53,4 ± 5,7	45,4 ± 4,8	48,2 ± 5,1

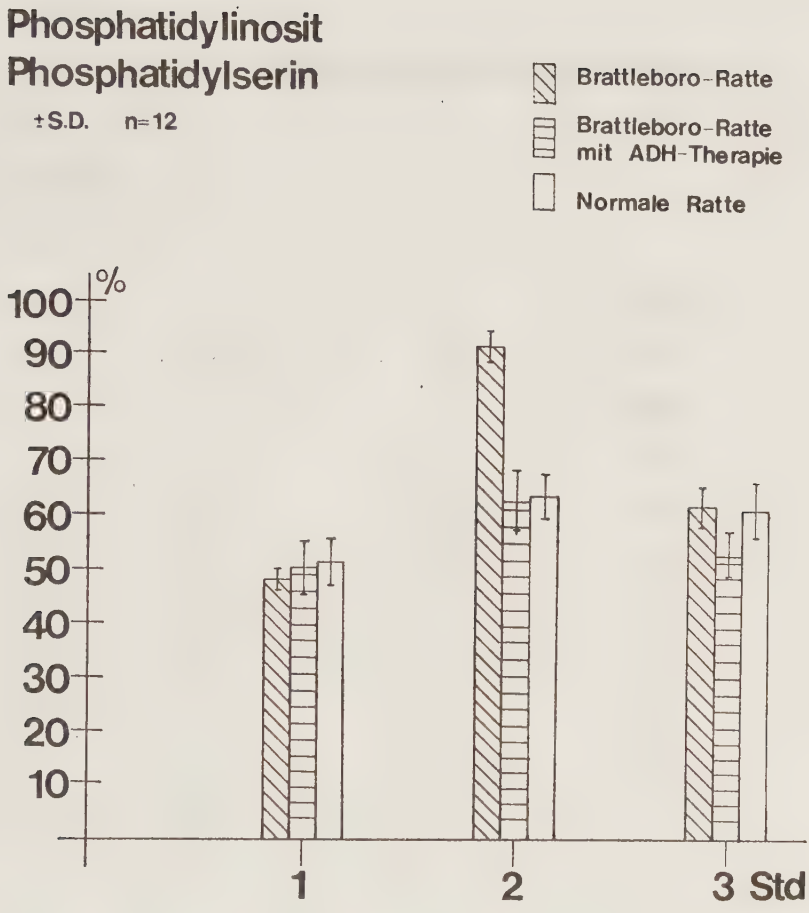


Fig. 7: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidylinosit und -serin

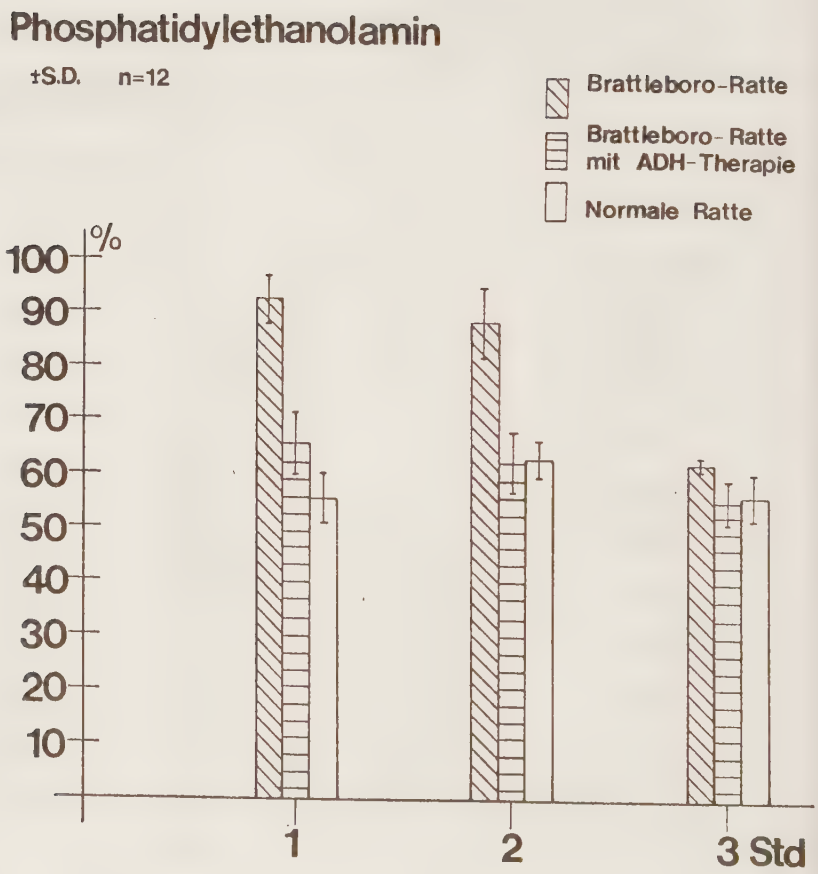


Fig. 8: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidylethanolamin der Bürstensaummembranen

Tabelle 9: Der Abteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidyl-inosit und -serin der Bürstensaummembranen der Rattenniere (n=12)

Versuchstiergruppe	1 Stunde nach der Injektion der Palmitinsäure	2 Stunden nach der Injektion der Palmitinsäure	3 Stunden nach der Injektion der Palmitinsäure
Brattleboro-Ratten	48,3 ± 2,0	91,2 ± 2,7	61,9 ± 3,5
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	50,3 ± 5,1	62,7 ± 5,9	52,4 ± 4,3
Normale Ratten	51,3 ± 4,5	62,9 ± 4,0	61,1 ± 5,1

Tabelle 10: Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (in %) im Phosphatidyl-ethanolamin der Bürstensaummembranen der Rattenniere (n=12)

Versuchstiergruppe	1 Stunde nach der Injektion der Palmitinsäure	2 Stunden nach der Injektion der Palmitinsäure	3 Stunden nach der Injektion der Palmitinsäure
Brattleboro-Ratten	92,3 ± 4,3	87,7 ± 6,6	62,4 ± 1,0
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	65,8 ± 5,9	62,1 ± 5,9	55,0 ± 4,1
Normale Ratten	55,4 ± 4,8	62,5 ± 3,5	55,8 ± 4,3

5.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der chromatographischen Methoden

Alle chromatographischen Trennungen wurden mit den isolierten Lipiden aus den Bürstensaummembranen der Nieren von Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten, eine, zwei und drei Stunden nach Applikation von 1-C^{14}-Palmitinsäure bzw. Palmitinsäure, durchgeführt.

Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide
Die dünnschichtchromatographische Trennung der Neutralfette und der Phospholipide war bei allen Versuchen einwandfrei. Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin konnten nicht getrennt werden.

Bestimmung der radioaktiven Einbauraten
Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, weichen die radioaktiven Einbauraten in die verschiedenen Phospholipide bei den Versuchstiergruppen Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten nicht wesentlich voneinander ab. Bei Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sind innerhalb der drei Stunden nach der Injektion mehr oder weniger fallende Tendenz zu verzeichnen. Phosphatidylinosit und -serin zeigen eine steigende Tendenz des radioaktiven Einbaues.
Bei der Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten erhält man ein anderes Bild des radioaktiven Einbaues. Während bei Sphingomyelin und Phosphatidylcholin die Einbauraten bis 120 Minuten nach der Injektion eine fallende Tendenz aufweisen, steigen sie nach 180 Minuten wieder auf den Ausgangswert an. Phosphatidylinosit und -serin zeigen eine steigende Tendenz des Einbaues, wie es auch bei den beiden anderen Versuchstiergruppen der Fall ist.

Bei Phosphatidylethanolamin ist ein Fallen der Radioaktivität bis zwei Stunden nach der Applikation zu beobachten, was sich nicht mehr weiter fortsetzt.
Die gemachten Aussagen beziehen sich auf den radioaktiven Einbau von C^{14} in die verschiedenen Phospholipide pro Milligramm Membranprotein. Die Konzentrationen der Phospholipide der Bürstensaummembranen wurden hierbei noch nicht berücksichtigt.

Quantitative und qualitative Analyse der Phospholipide der Bürstensaummembranen mittels HPLC
Anders als bei der Dünnschichtchromatographie lassen sich mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie die Phospholipide Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin trennen.
Die Konzentrationen der Phospholipide von Brattleboro-Ratten und von normalen Ratten sind annähernd gleich. Bei der Versuchstiergruppe Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie weichen die Konzentrationen der Phospholipide erheblich von den Werten der beiden obengenannten Tiergruppen ab und zeigen mit zunehmender Zeit eine fallende Tendenz. Während die Werte für Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin innerhalb der drei Stunden nach Applikation der Palmitinsäure auf ca. 50% fallen, findet man bei Phosphatidylinosit nur noch 25% des Wertes, der bei 60 Minuten gemessen wurde.
Setzt man die radioaktiven Einbauraten von 1-C^{14}-Palmitinsäure in Bezug zur tatsächlichen Konzentration der Phospholipide, so erhält man die in Tabelle 11 zusammengefassten Ergebnisse.
Die Werte von Phosphatidylcholin sind bei allen drei Versuchstiergruppen vergleichbar.
Normale Ratten und Brattleboro-Ratten unterscheiden

sich nicht wesentlich voreinander in Bezug auf den C^{14}-Einbau in Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit.
Bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie beobachtet man einen Anstieg der Radioaktivität, der bei den beiden anderen Versuchstiergruppen auch zu verzeichnen ist, jedoch nicht in dieser gesteigerten Form.
Der radioaktive Einbau in Phosphatidylethanolamin bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie steigt an, während er bei den Brattleboro-Ratten und normalen Ratten abnimmt.

Bestimmung der, an den Phospholipiden sitzenden Fettsäuren
Aus den Gaschromatogrammen, Abb. 22 bis 29, wie auch aus den graphischen Darstellungen, Fig. 5 bis 8, und den Tabellen 7 bis 10, geht hervor, daß bei Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und bei normalen Ratten an den Phospholipiden und Sphingomyelin je eine Position mit einer ungesättigten und eine Position mit einer gesättigten Fettsäure besetzt ist.

Die Phospholipide, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit und -serin, der Brattleboro-Ratten, zeigen zeitweise einen Anteil an ungesättigten Fettsäuren von z.T. über 90%, d.h. beide Positionen der Phospholipide sind fast ausschließlich von ungesättigten Fettsäuren besetzt. Bei Phosphatidylethanolamin 1 und 2 Stunden nach der Injektion der Palmitinsäure und bei Phosphatidylinosit und -serin 2 Stunden nach der Applikation.

Auffallend bei all diesen Ergebnissen ist, daß wenn irgendwelche Veränderungen an den Phospholipiden auftreten, diese immer nur bei Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinosit bzw. Phosphatidylinosit und -serin zu finden sind.

Tabelle 11: Die radioaktiven Einbauraten von 1-C^{14}-Palmitinsäure in die Phospholipide, in Bezug zu der tatsächlichen Konzentration der Phospholipide der Bürstensaummembranen (DPM/mg)

Versuchstiergruppe	x Min. nach Injektion	Phosphatidyl-inosit	Phosphatidyl-cholin	Phosphatidyl-ethanolamin
Brattleboro-Ratten	60	-----	262 ± 12,6	522 ± 47,5
	120	2168 ± 383,6	230 ± 1,1	438 ± 26,8
	180	4098 ± 544,6	302 ± 25,2	418 ± 34,8
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	60	1851 ± 134,4	358 ± 11,6	538 ± 10,9
	120	4681 ± 310,7	313 ± 22,6	622 ± 26,5
	180	13740 ± 1329,4	356 ± 29,2	729 ± 61,1
Normale Ratten	60	2976 ± 453,8	421 ± 12,2	616 ± 27,1
	120	6310 ± 208,9	314 ± 23,5	585 ± 7,1
	180	6884 + 972,2	321 + 24,6	490 + 36,0

6. Enzyme des Lipidstoffwechsel - Bestimmung der Enzymaktivität

Aus den unzähligen Enzymen des Lipidstoffwechels wurden zur Bestimmung in der Rattenniere die folgenden drei Enzyme ausgewählt:

ATP-Citrat-Lyase, auch Citrat Cleavage Enzym genannt,
Malic-Enzym und
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

Alle Versuche wurden mit den drei Versuchstiergruppen Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten durchgeführt. Die Nieren der Tiere wurden in vier verschiedene Zonen eingeteilt und die Homogenate der Zonen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten herangezogen.

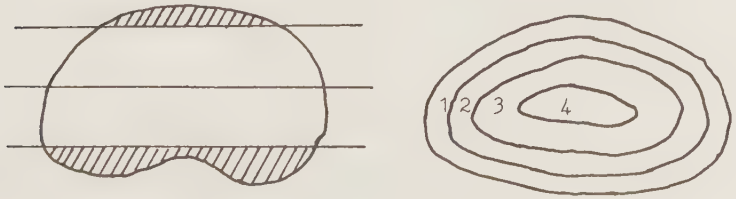
6.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten verwendet, davon waren zwei Drittel (20 Tiere) Brattleboro-Ratten mit einem Körpergewicht von 240 - 290 g und ein Drittel (10 Tiere) normale Ratten vom Long-Evans-Typ des gleichen Stammes und gleichen Alters, mit einem Körpergewicht von 250 - 320 g.
Die Hälfe der Brattleboro-Ratten (10 Tiere) wurde täglich mit 0,1 ml Pitressin-Tannat (Suspension in Öl) entsprechend 500 mU ADH durch subkutane Injektion (unter das Rückenfell) behandelt. Entsprechend wurden die restlichen Tiere, 10 Brattleboro-Ratten und 10 normale Ratten täglich mit der gleichen Menge sterilem Sesamöl behandelt.
Die Injektionen erfolgten täglich zur gleichen Zeit vierzehn Tage lang. Die letzte Applikation wurde

einen Tag vor Tötung der Tiere verabreicht.
Behandlungskontrolle siehe unter Punkt 5.3.2..

6.2. Versuchsdurchführung

Von den in drei Gruppen eingeteilten Versuchstieren wurden pro Tag drei Tiere, je eins von jeder Gruppe, verwendet.
Durch einen Schlag ins Genick wurden die Tiere getötet, die Nieren sofort entnommen und in eisgekühltes Homogenisiermedium (Histidin, Saccharose, EDTA, pH-Wert 6,9) gelegt. Nach zwei Minuten wurde, auf einer in Eis eingeschlossenen Petrischale mit einer Rasierklinge und zwei Pinzetten, zunächst die Nierenkapsel entfernt.
Dann wurden mit der Rasierklinge aus der Niere zwei dicke Scheiben, quer zur Papillenachse, herausgeschnitten. Durch Tangentialschnitte wurden die, mit dem bloßen Auge unterscheidbaren Nierenschichten in die vier Zonen Rinde, Markaußenstreifen, Markinnenstreifen und Innenzone (mit Papille), getrennt (siehe Abb. 30).



Querschnitte

Tangentialschnitte

1: Rinde
2: Markaußenstreifen
3: Markinnenstreifen
4: Innenzone (mit Papille)

Abb. 30: Präparation der Niere

Das Gewebe von den beiden Nieren der verschiedenen Zonen wurde mit einer Rasierklinge kleingehackt und je nach Zone mit einem bestimmten Volumen Homogenisiermedium in ein Glas-Teflon-Homogenisator gebracht. Mit 30 Hüben von Hand unter Vermeidung von Schaumbildung wurde das Gewebe homogenisiert (57).

Zusatzvolumen zum Homogenisieren:

1,00 ml zu Rinde und Markaußenstreifen
0,75 ml zu Markinnenstreifen
0,35 ml zur Innenzone

Zur Bestimmung der Enzyme Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und Malic-Enzym, wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäße von Rinde, Markaußenstreifen und Markinnenstreifen 2x je 100 µl sofort bei -60°C eingefroren. Von der Innenzone wurden 2x je 50 µl Homogenat eingefroren. Zur Eiweißbestimmung wurde ebenfalls von allen Zonen 50 µl Homogenat bei -60°C eingefroren. Die Bestimmung der Citrat-Lyase erfolgte sofort nach dem Homogenisieren.

6.3. Berechnung der spezifischen Aktivität

Die Berechnung der spezifischen Aktivität (spez. Akt.), erfolgte in Anlehnung an das Lambert-Beersche Gesetz, nach der folgenden Gleichung (59):

$$\text{Spez. Akt.} = \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot C_{\text{Protein}}} \times \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad (\text{U/mg})$$

ε = Extinktionskoeffizient ($cm^2/\mu Mol$)
ΔE = Extinktionsänderung
Δt = Messintervall (min)
V = Testvolumen (ml)
v = Probevolumen im Test (ml)
d = Schichtdicke (cm)
C_{Protein} = Proteinkonzentration in der Probe (mg/ml)

Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter Punkt 3.6. beschrieben.

Die Konstanten der Formel wurden zu dem Berechnungsfaktor ($F_{Ber.}$) zusammengefasst:

$$F_{Ber.} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

Die vereinfachte Formel lautet dann:

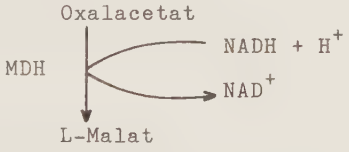
$$\text{Spez. Akt.} = F_{Ber.} \times \frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{1}{C_{Protein}} \quad (U/mg)$$

6.4. Bestimmung der Citrat-Lyase (EC 4.1.3.6.)

Die Citrat-Lyase wurde nach A.P. Srere (58) in der folgenden Reaktion bestimmt:

$$\text{Citrat + ATP + Coenzym A} \xrightarrow{Mg^{++}} \text{Acetyl-Coemzym A + Oxalacetat + ADP + } P_i$$

Indikatorreaktion (78):



6.4.1. Durchführung des Testes

Die Reaktion wurde mit unverdünntem Homogenat, (Innenzone 50 µl, restliche Schichten je 100 µl), in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß vorbereitet, 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand in eine 1 cm Meßküvette umgefüllt und die Extinktionsänderung über 5 Minuten gemessen (Vorlauf der Reaktion). Dann wurde die

Reaktion mit der Zugabe von ATP gestartet und die Extinktionsänderung über 5 Minuten gemessen.

Testansatz	Volumen in der Küvette
0,1 M Tris-Puffer, pH 7,3	0,10 ml
0,1 M Magnesiumchlorid	0,10 ml
0,2 M Kaliumcitrat	0,10 ml
0,1 M Mercaptoethanol	0,10 ml
Malic-Dehydrogenase 10 000 U/ml	0,05 ml
Coenzym A 10 mg/ml	0,03 ml
NADH 10 mg/ml	0,05 ml
bidest. Wasser	0,40 ml
Homogenat: Rinde,Markaußen-streifen und Markinnenstreifen	0,02 ml
Homogenat: Innenzone	0,05 ml
---------- VORLAUF ----------	
Start:	
0,1 M ATP	0,05 ml

Der Test wurde in 1 cm Küvetten bei 340 nm an einem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt.

6.4.2. Ergebnisse

Die Enzymaktivität der Citrat-Lyase konnte mit der angewandten Methode nur im Homogenat der Innenzone und im Markinnenstreifen nachgewiesen werden. Graphisch sind die Ergebnisse in Fig. 9 dargestellt und die Zahlenwerte in der nachfolgenden Tabelle 12 zusammengefasst.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden.

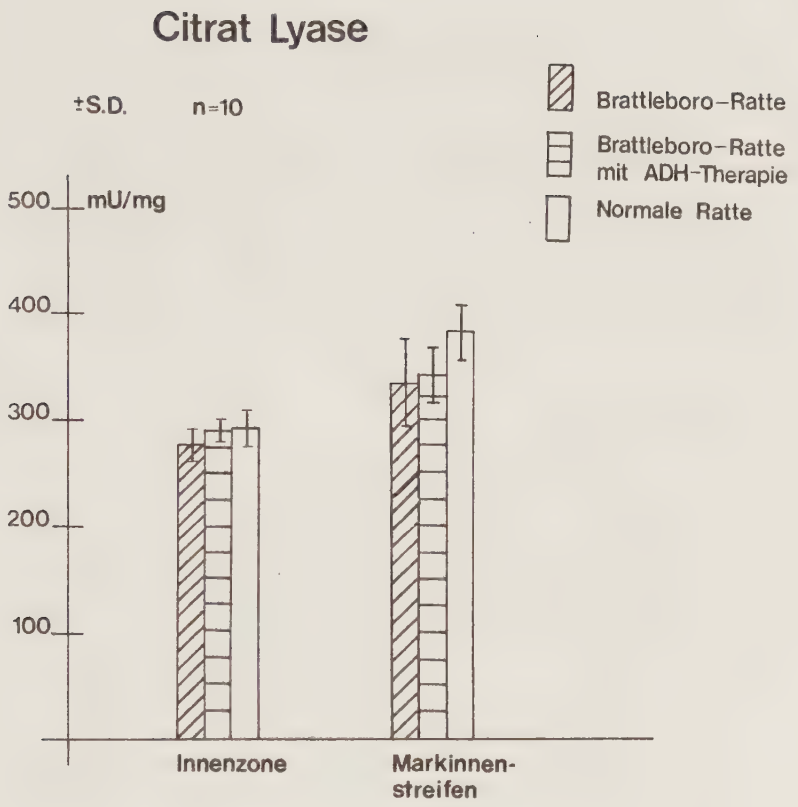


Fig. 9: Graphische Darstellung der Enzymaktivität der ATP-Citrat-Lyase im Homogenat verschiedener Schichten der Rattenniere (mU/mg)

Tabelle 12: Spezifische Aktivität der Citrat-Lyase in mU/mg Protein

Nierenzone	Brattelboro-Ratten	Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	Normale Ratten
Innenzone	276 ± 18	291 ± 23	292 ± 31
Markinnen-streifen	335 ± 40	340 ± 25	393 ± 30

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von je 10 Tieren.

6.4.3. Besprechung der Ergebnisse

Zunächst muß festgestellt werden, daß die spez. Enzymaktivität der Citrat-Lyase mit den angewandten Verfahren nach Srere nur in der Innenzone und im Markinnenstreifen bestimmt werden konnte.
In diesen beiden Nierenzonen ist zwischen den drei verschiedenen Versuchstiergruppen kein signifikanter Unterschied nachweisbar.
Es kann lediglich festgestellt werden, daß die maximale Enzymaktivität der Citrat-Lyase im Markinnenstreifen der Rattenniere zu finden ist.

6.5. Bestimmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)

Die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase wurde nach Bergmeyer (59) in folgender Reaktion bestimmt:

$$\text{Glucose-6-phosphat} + NADP^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{Gluconat-6-phosphat} + NADPH + H^+$$

6.5.1. Durchführung des Testes

Zur Durchführung der Reaktion wurden die eingefrorenen Proben 2 Minuten vor Reaktionsbeginn aufgetaut. Es wurde unverdünntes Homogenat verwendet (Innenzone 50 µl, die restlichen Schichten je 100 µl).
Die Reaktion wurde in 5 ml Reagenzröhrchen mit Schliff gestartet, 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand sofort in die Meßküvette umgefüllt und die Extinktionsänderung über fünf Minuten gemessen.

Testansatz		Volumen in der Küvette
0,1 M Triethanolamin-Puffer, pH 7,6		2,59 ml
0,1 M Magnesiumchlorid		0,20 ml
Glucose-6-phosphat (Na-salz)	10 mg/ml	0,10 ml
NADP	10 mg/ml	0,10 ml
Homogenat: Rinde, Markaußenstreifen, Markinnenstreifen		0,10 ml
Innenzone		0,05 ml

Der Test wurde in 3 ml Glasküvetten bei 340 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt.

6.5.2. Ergebnisse

Glucose-6-phosphat Dehydrogenase konnte mit der angewandten Bestimmung in allen Nierenzonen nachgewiesen werden. Fig. 10 zeigt die graphische Darstellung der spez. Enzymaktivität und die Zahlenwerte sind in der nachfolgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden.

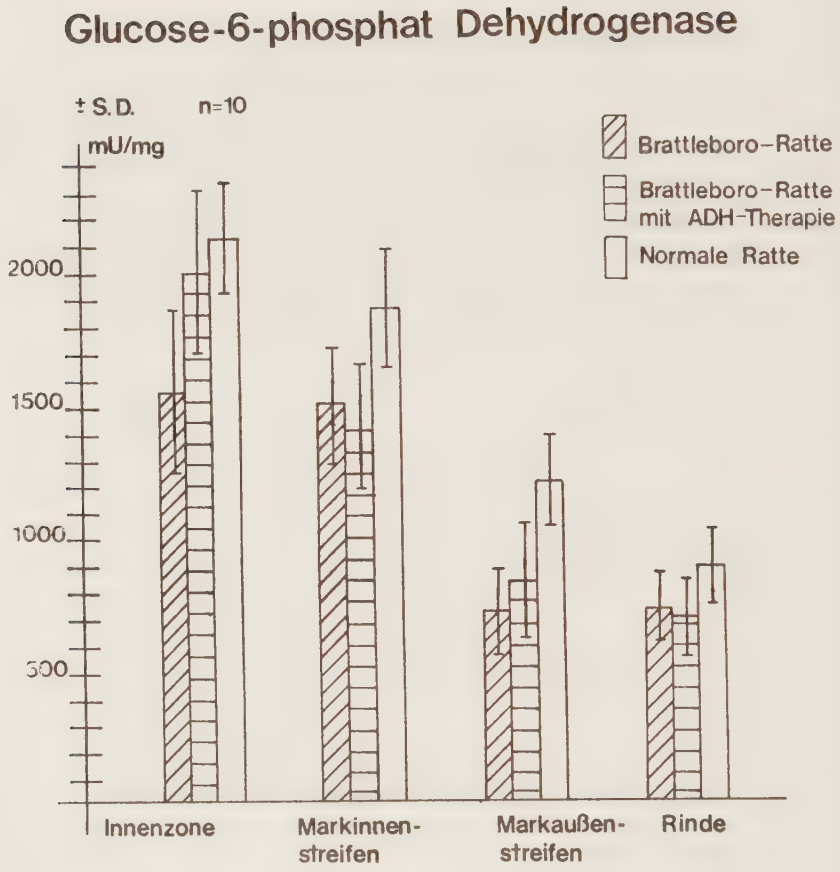


Fig. 10: Graphische Darstellung der Enzymaktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase im Homogenat verschiedener Schichten der Rattenniere (mU/mg)

Tabelle 13: Spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in mU/mg Protein

Nierenzone	Brattleboro-Ratten	Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	Normale Ratten
Innenzone	1520 ± 343	1971 ± 334	2011 ± 206
Markinnen-streifen	1484 ± 115	1379 ± 150	1832 ± 229
Markaußen-streifen	692 ± 164	811 ± 224	1190 ± 169
Rinde	707 ± 119	677 ± 149	866 ± 149

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von je 10 Tieren.

6.5.3. Besprechung der Ergebnisse

Maximale Enzymaktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase kann bei allen drei Versuchstiergruppen in der Innenzone der Niere festgestellt werden. Zwischen den normalen Ratten und den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie ist kein signifikanter Unterschied der spezifischen Aktivität in allen Nierenzonen zu beobachten.
Betrachtet man die Werte der spez. Aktivität in der Innenzone und dem Markaußenstreifen von Brattleboro-Ratten und normalen Ratten, so stellt man in den genannten Schichten eine erniedrigte Enzymaktivität bei den Brattleboro-Ratten fest.

6.6. Bestimmung des Malic Enzym (EC 1.1.1.38)

Malic Enzym wurde nach Bücher (78) in folgender Reaktion bestimmt:

$$\text{L-Malat} + \text{NADP}^{+} \xrightarrow{Mg^{++}} \text{Pyruvat} + CO_2 + \text{NADPH} + H^{+}$$

Die Aktivitätsbestimmung des NADP-spezifischen Enzyms erfolgt in der von links nach rechts ablaufenden Reaktion in Gegenwart von Mg^{++}-Ionen, da die in ihrer Wirkung dem Magnesium überlegenen Mn^{++}-Ionen bei der im pH-Optimum des Enzyms durchgeführten Messung leicht als Manganhydroxid oder in Gegenwart von Phosphat (Gewebe) als basische Manganphosphate ausfallen.

6.6.1. Durchführung des Testes

Die Aufarbeitung des Homogenates der verschiedenen Nierenzonen erfolgte wie unter Punkt 6.4.1. beschrieben. Zur Durchführung der Reaktion wurden je 100 µl des Homogenates von Rinde, Markaußenstreifen und Markinnenstreifen, sowie 50 µl von der Innenzone verwendet.

Testansatz		Volumen in der Küvette
50,0 mM	Triethanolamin-Puffer	0,50 ml
5,0 mM	EDTA	0,10 ml
8,0 mM	Magnesiumsulfat	0,10 ml
0,4 mM	NADP	0,03 ml
200,0 mM	L-Malat	0,01 ml
bidest. H_2O		0,16 ml
Homogenat:	Rinde, Markaußenstreifen, Markinnenstreifen	0,10 ml
	Innenzone	0,05 ml

Der Test wurde in 1 cm Küvetten bei 340 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt.

6.6.2. Ergebnisse

Malic Enzym konnte mit der angewandten Bestimmung in allen Nierenzonen nachgewiesen werden.
Fig. 11 zeigt die graphische Darstellung der spez. Aktivität, die Zahlenwerte sind in der nachfolgenden Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Spezifische Aktivität von Malic Enzym in mU/mg Protein

Nierenzone	Brattleboro-Ratten	Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie	Normale Ratten
Innenzone	480 ± 101	462 ± 131	725 ± 150
Markinnenstreifen	434 ± 26	336 ± 55	478 ± 98
Markaußenstreifen	360 ± 40	268 ± 62	386 ± 95
Rinde	211 ± 35	217 ± 30	210 ± 24

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von je 10 Tieren.

6.6.3. Besprechung der Ergebnisse

Maximale Enzymaktivität von Malic-Enzym kann bei allen drei Versuchstiergruppen in der Innenzone der Niere festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchstiergruppen konnten keine festgestellt werden.

Anmerkung: Die Herstellerfirmen der verwendeten Apparate und Chemikalien sind unter Punkt 8 zu finden.

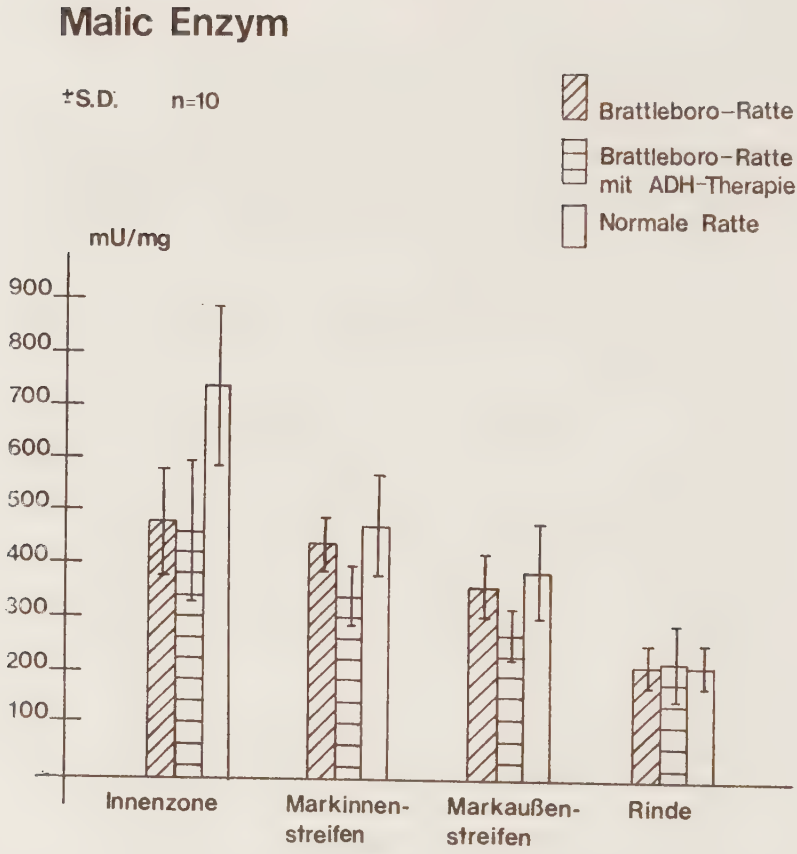


Fig. 11: Graphische Darstellung der Enzymaktivität von Malic Enzym im Homogenat verschiedener Schichten der Rattenniere (mU/mg)

6.7. Zusammenfassung der enzymatischen Bestimmungen

Citrat Lyase (EC 4.1.3.6.) konnte mit dem angewandten Verfahren in der Innenzone und im Markinnenstreifen nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchstiergruppen wurden nicht festgestellt. Im Markinnenstreifen der Niere wurde das Aktivitätsmaximum für die Citrat-Lyase festgestellt.

Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) wurde in allen Nierenzonen nachgewiesen. Das Aktivitätsmaximum lag bei allen Versuchstieren in der Innenzone der Niere. Die spez. Aktivität des Enzyms im Homogenat der Innenzone und des Markaußenstreifen lag bei den Brattleboro-Ratten deutlich unter den Aktivitätswerten der gleichen Nierenzonen von normalen Ratten (Long-Evans).

Malic-Enzym (EC 1.1.1.38) konnte in allen Nierenzonen nachgewiesen werden. Das Aktivitätsmaximum des Enzyms lag bei allen Versuchstieren in der Innenzone der Niere. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchstiergruppen wurden nicht festgestellt.

Bei allen drei untersuchten Enzymen sind die Aktivitätsmaxima im Niereninneren (Innenzone und Markinnenstreifen) zu finden. Die spez. Aktivität nimmt zur Nierenrinde hin ab.

7. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen der Lipide der Bürstensaummembranen der Rattenniere wurden alle Versuchstiere mit 1,4 mM Palmitinsäure pro 100 g Körpergewicht bzw. mit radioaktiver 1-C^{14}-Palmitinsäure gleicher Molarität, eine, zwei oder drei Stunden vor Eintreten des Todes, behandelt.

Die Phospholipide der Bürstensaummembranen von Ratten mit angeborenem Diabetes insipidus (Brattleboro-Ratten), welche mit ADH über 14 Tage behandelt wurden, nahmen, nach der Injektion der Palmitinsäure stark ab. Phosphatidylinosit weist drei Stunden nach der Applikation nur noch 25% des Wertes der ersten Stunde auf.
Bei den Brattleboro-Ratten ist ebenfalls eine Konzentrationsabfall der Phospholipide der Bürstensaummembranen zu verzeichnen, allerdings in nicht so starkem Maße wie es bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie der Fall ist.
Bei den normalen Ratten (Long-Evans) sind derartige Beobachtungen nicht zu machen.
Die gemachten Ergebnisse sind in den Tabelle 6 und in den Fig. 1 bis 4 zu finden.

Der Einbau von Radioaktivität der 1-C^{14}-Palmitinsäure nimmt bei Phosphatidylinosit durch die drei Stunden hindurch bei allen Versuchstieren zu, bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie allerdings um ein Vielfaches mehr als bei den beiden anderen Versuchstiergruppen. In das Phosphatidylcholin ist der Einbau bei allen Versuchstieren gleichbleibend.
Phosphatidylethanolamin weist Unterschiede bei den verschiedenen Rattengruppen auf. Während der radioaktive Einbau bei Brattleboro-Ratten und normalen

Ratten abnimmt, steigt er bei Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie an.
Zu diesen Ergebnissen vergleiche Tabelle 11.

Bei der gaschromatographischen Analyse der, an den Phospholipiden befindlichen Fettsäuren, sind die in den Tabellen 7 bis 10, in den Fig. 5 bis 8 und in den Abb. 22 bis 29 dargestellten Ergebnisse erzielt worden.
Dabei zeigt sich, daß bei normalen Ratten und Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie die Phospholipide der Bürstensaummembranen der Niere, eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure enthalten.
Die Phospholipide der Brattleboro-Ratten, Phosphatidylinosit und/oder Phosphatidylserin sowie Phosphatidylethanolamin zeigen, daß zeitweise nur ungesättigte Fettsäuren im Molekül vorhanden sind.

Bei den Untersuchungen der Enzymaktivitäten von Citrat-Lyase, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und Malic-Enzym im Homogenat der vier Nierenzonen, Rinde, Markaußenstreifen, Markinnenstreifen und Innenzone, konnten signifikante Unterschiede nur bei der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase festgestellt werden.
Brattleboro-Ratten weisen deutlich niedrigere Enzymaktivitäten in der Innenzone und im Markaußenstreifen der Niere auf als in den gleichen Nierenzonen der normalen Ratten.
Als allgemeines Ergebnis für die drei oben genannten Enzyme gilt: Die Enzymmaxima dieser drei Enzyme in der Niere wurden in der Innenzone bzw. im Markinnenstreifen gefunden. Zur Nierenrinde hin werden die spez. Aktivitäten geringer.

7.1. Diskussion

Der Wasserhaushalt der Säugetiere wird über die Niere einzig von ADH hormonell geregelt (61). Die durch das Hormon bewirkten biochemischen Reaktionen führen zu einer Permeabilitätsänderung der Membranen gegenüber Wasser (62, 63, 64).
ADH wirkt im distalen Tubulus und in den Sammelrohren. Es wird von einem speziellen Hormonrezeptor, der in den basalen und/oder lateralen Membranen lokalisiert ist, gebunden. Durch das Hormon wird das Rezeptorprotein so verändert, daß die Adenylat-Zyklase allosterisch aktiviert und ATP in 3'-5'-cyclo-AMP verwandelt wird. Cyclo-AMP, auch second messenger genannt, wirkt in der Zelle auf verschiedene Prozesse ein. Es kann Enzymsysteme aktivieren, außerdem vermag cyclo-AMP Transportsysteme in der Membran zu beeinflussen. Auf diese Weise kommt die Rückresorption des Wassers zustande (2).
Durch die Zunahme der osmotischen Konzentration im Blut wird eine ADH-Freisetzung im Hypothalamus bewirkt. Gleichzeitig löst die Zunahme der Osmolarität des Blutes Durstgefühl aus. Umgekehrt wird bei Wasserüberschuß infolge der verminderten osmotischen Konzentration die ADH-Freisetzung gehemmt und damit die Wasserausscheidung gefördert (1).
Phospholipide sind wegen ihres Aufbaues für die Transportmechanismen von biologischen Membranen entscheidend. Die Aufrechterhaltung der konstanten Konzentrationen der Phospholipide bewirkt, trotz eines dynamischen turnover, ein aktives Stoffwechselsystem (71).
Unter normalen Bedingungen wird die Anzahl der verbrauchten Phospholipide durch eine kontinuierliche Synthese dieser Phospholipide ausbalanciert. Infolge veränderten äußeren Bedingungen, im physiologischen

Stress, wird die Konzentration der abgebauten Phospholipide gegenüber den synthetisierten erhöht, d.h. die Gesamtkonzentration der Phospholipide nimmt ab (71).

Die Hauptmenge der Bürstensaummembranen sind in der Nierenrinde lokalisiert (65). Mehr als 90% der gesamten Nierendurchblutung betreffen das Rindengebiet. Nur ein kleiner Prozentsatz betrifft das Mark, etwa 1% fließt durch die Papille (68).

Aus den vorangestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß bei normalen Ratten eine Erhöhung der gesättigten Fettsäuren im Blut, bedingt durch die Injektion der Palmitinsäure, keinerlei Einfluß auf die Konzentrationen der Phospholipide in den Bürstensaummembranen der Nieren ausübt (Tab. 6; Fig. 1 bis 4).
Anders bei den Brattleboro-Ratten. Hier bewirkt der Überschuß an Palmitinsäure im Blut eine Konzentrationsabschwächung der Phospholipide in den Bürstensaummembranen der Nieren. Diese Ratten-Mutante lebt ständig mit einer erhöhten Osmolarität des Blutes, die auch das ständige Durstgefühl der Tiere auslöst (vgl. Tab. 4: Wasseraufnahme der Versuchstiere).
Mit der Verabreichung der Palmitinsäure wurde nun erneut die Osmolarität verändert, es ändern sich die äußeren Bedingungen die zu einem Abbau der Phospholipide führen, dem die Synthese nicht mehr nachkommt. Bei den Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie tritt dieser Effekt noch verstärkt auf. Durch ADH wird die Osmolarität des Blutes herabgesetzt. Nun wird zusätzlich, durch die Applikation der Palmitinsäure, die Osmolarität erneut verändert. Die Folge davon ist ein drastischer Konzentrationsabfall aller in der Bürstensaummembran enthaltenen Phospholipide.
Die Veränderung der Osmolarität des Blutes und das

Überangebot an Palmitinsäure müssen Phospholipide abbauende Enzyme aktivierten (Phospholipasen), die dazu beitragen, daß die abgebauten Phospholipide durch das aktive Stoffwechselsystem, zur Aufrechterhaltung der Phospholipidekonzentration in dem Maße nicht mehr ersetzt werden können.

Betrachtet man die Einbauraten von 1-C^{14}-Palmitinsäure in die Phospholipide der Bürstensaummembranen der Rattennieren, so stellt man fest, daß ein dynamischer turnover zur Aufrechterhaltung der Phospholipidekonzentration stattfinden muß. Bei den normalen Ratten ist die Phospholipidkonzentration gleichbleibend und trotzdem wurden radioaktive Einbauraten festgestellt (Tab. 5 und 11).
Bei Phosphatidylinosit der Bürstensaummembranen der Nieren von normalen Ratten und Brattleboro-Ratten ist ein erhöhter turnover zu beobachten. Wahrscheinlich wird dieser Effekt bei den normalen Ratten durch das Überangebot an Palmitinsäure bewirkt. Da keine Konzentrationsänderung des Phosphatidylinosit vorliegt, muß auch ein erhöhter Abbau dieses Phospholipides mit dem erhöhten turnover einhergehen.
Bei den Brattleboro-Ratten ist auch ein erhöhter turnover am Phosphatidylinosit, im gleichen Maß wie bei den normalen Ratten, zu beobachten. Hier nimmt jedoch die Konzentration dieses Phospholipides in der Membran ab. Durch die veränderte Osmolarität im Blut, die wahrscheinlich ein Aktivieren der Phospholipasen bedingt, werden trotz erhöhten turnovers mehr Phospholipide abgebaut.
Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie weisen bei Phosphatidylinosit und Phosphatidylethanolamin einen zum Teil sehr stark erhöhten turnover und gleichzeitig einen drastischen Konzentrationsabfall aller Phospho-

lipide auf. Dem durch ADH bedingten Konzentrationsabfall, kann das Überangebot an Fettsäuren und der dadurch bedingte erhöhte turnover nicht mehr entgegentreten.

Bei der gaschromatographischen Analyse der an den Phospholipiden der Bürstensaummembranen sitzenden Fettsäuren wurden bei Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und bei normalen Ratten pro Molekül eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure nachgewiesen. Van Deenen (3) machte bei seinen Untersuchungen der Phospholipide die gleichen Beobachtungen. Im Phosphatidylinosit und Phosphatidylethanolamin bei den Brattleboro-Ratten wurden zeitweise, eine und zwei Stunden bzw. zwei Stunden nach der Injektion der Palmtinsäure, zwei ungesättigte Fettsäuren pro Molekül nachgewiesen (Tab. 9 und 10; Fig. 7 und 8). Membranen tolerieren gewisse Variationen in der Fettsäurezusammensetzung von Phospholipid-Spezies. Die Spezifität der Enzyme ist wohl ein Instrument zur Kontrolle der physikochemischen Eigenschaften von Membranen innerhalb festgelegter Grenzwerte. Enzyme regulieren weiterhin die Adaption in der Lipid-Zusammensetzung infolge Anpassung an veränderte äußere Bedingungen (3).
Es ist bekannt, daß bei Membranen mit ungesättigten Phospholipiden, (d.h. das Phospholipid enthält zwei ungesättigte Fettsäuren im Molekül), die Barrieren durchlässiger werden als bei solchen mit gesättigten Phospholipiden (hier enthält das Moleküle eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure) (3).
Infolge einer erhöhten Osmolarität im Blut und einem Überangebot an Palmitinsäure stellen sich die physikochemischen Eigenschaften der Bürstensaummembranen

von Brattleboro-Ratten auf die veränderten Bedingungen ein.
In der Nierenrinde erfolgt die Energiegewinnung für die tubulären Zelleistungen ganz überwiegend oxidativ. Freie Fettsäuren dienen vornehmlich als Substrate (76). Das Überangebot an Palmitinsäure gelangt durch erleichtete Diffusion durch die Membran. Bei der erleichterten Diffusion (72 - 75) müssen spezielle Einrichtungen in der Membran existieren, die beim Vorliegen von einer extra-intrazellularen Konzentrationsdifferenz die Stoffpermeation durch die Membran beschleunigen und früher einen Konzentrationsausgleich herbeiführen. Der Membrantransport durch erleichterte Diffusion zeigt eine Sättigungscharakteristik. Man geht davon aus, daß ein spezifischer Carrier (Träger) vorhanden ist. Die Sättigung des Transportes wäre dann auf eine begrenzte Anzahl von Trägern zurückzuführen.
Möglicherweise tritt bei den Brattleboro-Ratten ein zweites System in Aktion, welches das überlastete Carrier-System entlastet, um so der durch die Verabreichung der Palmitinsäure nochmalige Veränderung der Osmolarität entgegenzuwirken. Hall et al. machte bei Brattleboro-Ratten Beobachtungen, die auf ein solches System hindeuten (78).
Der Überschuß an Palmitinsäure allein reicht noch nicht aus, um einen Umbau der Membranen zu veranlassen wie man bei Brattelboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten sehen kann. Durch die zusätzlich erhöhte Osmolarität wird ein Teil der Phospholipide dahingehend umgebaut,die Membran permeabler zu gestalten.

Bei den Aktivitätsbestimmungen von Citrat-Lyase, Malic-Enzym und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in

verschiedenen Nierenzonen von Brattleboro-Ratten, Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie und normalen Ratten, konnte lediglich schon erarbeitetes festgestellt werden.
Die Aktivitätsmaxima aller drei Enzyme liegen im Markinnenstreifen oder in der Innenzone. Dies beweist erneut die Heterogenität der Niere. Auch kann die von Wirthenson und Guder (66,67) gemachte Aussage, daß die Lipide in der Nierenrinde der Ratte überwiegend als Brennstoff der oxidativen Energiegewinnung zugeführt werden und daher vorwiegend aus dem Blut und weniger der endogenen Synthese entstammen, bestätigt werden (69,70) Auch die Tatsache, daß Ullrich (77) im inneren Nierenmark der Ratte eine erhöhte Phospholipidekonzentration gegenüber den anderen Nierenzonen fand, steht im Einklang mit einer gesteigerten Lipidsynthese der inneren Nierenzonen.
Signifikante Unterschiede der spezifischen Enzymaktivitäten bei den drei Versuchstiergruppen konnten bei der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase im Markaußenstreifen und in der Innenzone zwischen Brattleboro-Ratten und normalen Ratten beobachtet werden. Klöppel (57), der ebenfalls die Enzymaktivitäten der Rattenniere untersuchte, stellte eine Hemmung der Fructose-6-phosphatkinase (EC 2.7.1.11.) im Homogenat des Markinnenstreifens von Brattleboro-Ratten gegenüber normalen Ratten (Long-Evans) fest. Er meinte, daß ein verstärkter Stoffdurchsatz auf dem Phosphogluconatweg beschritten werde. Diese Aussage kann mit dem vorliegenden Ergebnis, einer Verminderung der Enzymaktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in der Innenzone und im Markaußenstreifen in Einklang

gebracht werden. Während in der Innenzone und im Markaußenstreifen durch die Hemmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase überwiegend eine vollständige Glykolyse abläuft, findet im Markinnenstreifen der Stoffdurchsatz über den Phosphogluconatweg statt. Dieser Schritt ist bei Säugetieren vor allem in Geweben mit hoher Rate an Lipogenese zu finden (79).

7.2. Zusammenfassung

Das Anliegen dieser Arbeit war, Aussagen über die Lipidzusammensetzung der Bürstensaummembran der Rattenniere unter dem Einfluß von ADH zu ermöglichen.
Die Untersuchung der kleinen Auswahl von Enzymen sollte Aufschluß darüber geben, inwieweit ADH Einfluß auf die Enzymaktivität ausübt.
Im Folgenden sind die Ergebnisse kurz aufgeführt:

1. Die Phospholipidkonzentrationen in den Bürstensaummembranen der Niere von Brattleboro-Ratten nehmen nach Applikation von 1,4 mM Palmitinsäure pro 100 g Körpergewicht ab.
2. Ebenfalls nimmt die Konzentration der Phospholipide der Bürstensaummembranen der Nieren von Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie stark ab.
3. Ein dynamischer turnover bei allen drei Versuchstiergruppen ist nach Injektion von 1-C^{14}-Palmitinsäure bei allen Phospholipiden der Bürstensaummembranen zu verzeichnen. Bei Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie ist ein stark erhöhter turnover bei Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit zu erkennen.
4. Die Phospholipide aus den Bürstensaummembranen der Nieren noramler Ratten und Brattleboro-Ratten mit ADH-Therapie enthalten pro Molekül eine ungesättigte und eine gesättigte Fettsäure.

5. Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren der Phospholipide aus den Bürstensaummembranen der Brattleboro-Ratten ergab, daß zeitweise zwei ungesättigte Fettsäuren in einem Molekül vorhanden sind. Diese Aussage gilt für Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit und/oder Phosphatidylserin.
6. Das Aktivitätsmaximum der Citrat-Lyase (EC 4.1.3.6.) wurde im Markinnenstreifen der Rattenniere festgestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen wurden keine gefunden.
7. Für Malic-Enzym (EC 1.1.1.38) lag das Maximum der spez. Enzymaktivität in der Innenzone der Nieren bei allen drei Versuchstiergruppen.
8. Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) zeigt ebenfalls ein Aktivitätsmaximum in der Innenzone der Niere. Zwischen den normalen Ratten und den Brattleboro-Ratten wurden in dem Markaußenstreifen und in der Innenzone deutlich verminderte Enzymaktivitäten der letztgenannten Versuchstiergruppe angetroffen.

8. Chemikalien, Apparate, Versuchstierlieferanten

Volumemmessung: kleine Volumina
Kolbenhub-Pipetten,
Fa. Eppendorf

mittlere und große Volumina
Glasgeräte,
Fa. Schott & Gen., Mainz

zu Punkt 3.1.: Reinigung des Rinderalbumin

Rinderalbumin Fraktion V 96 - 99%
Fa. Sigma Nr. A 4503

Humanalbumin elektrophoretischer Reinheit 100%
Fa. Behringwerke AG, Nr. 4965 C

zu Punkt 3.2.: Bindung der 1-C^{14}-Palmitinsäure an Albumin

1-C^{14}-Palmitinsäure 250 Microcurie (µCi)
Code CFA. 23, Batch 106
Fa. Mersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig

zu Punkt 3.3.: Gewinnung des Nierenhomogenates

D(-)-Mannit
Fa. Merck, Art. 5980

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan p.A.
Fa. Merck, Art. 8382

zu Punkt 3.4.: Präparation der Bürstensaummembranen

Calciumchlorid-2-hydrat krist. ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
Fa. Merck, Art. 2382

Zentrifuge: Sorvall RC-5B Refrigerated
Superspeed Centrifuge
Du Pont Instruments

zu Punkt 3.5.: Extraktion der Lipide

Chloroform p.A.
Fa. Merck, Art. 2445

Methanol p.A.
Fa. Merck, Art. 8045

zu Punkt 3.6.: Proteinbestimmung

Kalium-Natrium-Tatrat ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$)
Fa. Merck, Art. 8087

Kupfersulfat
Fa. Merck, Art. 2790

Kaliumjodit
Fa. Merck, Art. 5044

Natriumhydroxid
Fa. Merck, Art. 6498

Photometer: Zeiss Spektralphotometer PM 2 D

zu Punkt 3.7.: Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Monotest für alkalische Phosphatase
Fa. Boehringer Mannheim, Best.Nr. 123 846

zu Punkt 5.2.1. Versuchstiere

Versuchstiere: männliche Sprague-Dawley-Ratten
Fa. Mus-Rattus, München Bruntal

Futter: Standarddiät 1324
Fa. Altromin GmbH, Lage

zu Punkt 5.2.2.: Versuchsdurchführung

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien: Kieselgel 60 F_{254}, 20 x 20 cm
Schichtdicke o,20 mm
Fa. Merck, Art. 5554

Laufmittel: Chloroform p.A.
Fa. Merck, Art. 2445

Methanol p.A.
Fa. Merck, Art. 8045

Eisessig 96%
Fa. Merck, Art. 62

Petroleumbenzin Sdp. 40 - 60°C
Fa. Merck, Art. 1775

Diethylether
Fa. Merck, Art. 921

Szintillationslösung 1
50 g PRO; 0,625 g POPOP in 10 l Toluol
Fa. Roth, Best.Nr. 3050

Liquid Szintillation Counter Mark II
Zinsser Analytik GmbH; Frankfurt

Phospholipide - Vergleichsubstanzen

Sphingomyelin
Fa. Sigma Best.Nr. S 0756

L-α-Phosphatidylcholin
Fa. Sigma Best.Nr. P 6638

L-α-Phosphatidylethanolamin
Fa. Sigma Best.Nr. P 6386

L-α-Phosphatidylinosit
Fa. Sigma Best.Nr. P 5766

L-α-Lysophosphatidylcholin
Fa. Sigma Best.Nr. L 5004

zu Punkt 5.3.: Brattleboro-Ratte

Versuchstiere: männliche Brattleboro-Ratten
Fa. Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Zeist, Holland

Futter: Standarddiät 1324
Fa. Altromin GmbH, Lage

zu Punkt 5.3.1.: Behandlung mit Antidiuretischem Hormon

Pitressin-Tannat: 1 Ampulle zu 1 ml enthält 5 I.E. Vasopressintannat
Fa. Parke-Davis, München
Reg.Nr. P 1099 Spez.Reg.Nr. 14124

Sesamöl, steril Chg. 039
Fa. Schering AG, Berlin

Halothan (2-Brom-2-chlor 1,1,1 trifluorethan mit 0,01% Thymol als Stabilisator)
Fa. Hoechst AG, Reg.Nr. H 120

zu Punkt 5.5.3.: Versuchsdurchführung

n-Hexan für Chromatographie; LiChrosolv
Fa. Merck, Art. 4391

Acetonitril für Chromatographie; LiChrosolv
Fa. Merck, Art. 30

Methanol für Chromatographie; LiChrosolv
Fa. Merck, Art. 6007

ortho-Phosphorsäure min. 85%; Suprapur
Fa. Merck, Art. 552

Hibar-Fertigsäule RT
Pre-Packed Column RT
250-4
LiChrosorb Si60 (10µm)
Cat. 50387 Fa. Merck

Waters Medel 440 Absorbance Detektor

Waters Pumpe M 45

Waters Wisp 710 A

Variabler Wellenlängen Detektor
Spectro Monitor III
Fa. Latek, Heidelberg

Phospholipide s. Punkt 5.2.2.

zu Punkt 5.6.3.: Versuchsdurchführung

Gaschromatograph: Gerät 5840 A der Fa. Hewlett Packard
mit GC Terminal 5840 A

Bortrifluoriddiethyletherat
Fa. Serva Best.Nr. 15175

Ethylenglycolmonoethylether (2-Methoxyethanol)
Fa. Merck, Art. 666

Molekularsieb 5 Å, Perlform etwa 2 mm
Fa. Merck, Art. 5705

Petrolether (2x destilliert)
zur Rückstandsanalytik Sdp. 40 - 60C°
Fa. Merck, Art. 1772

Natriumhydrogencarbonat p.A.
Fa. Merck, Art. 6329

Natriumchlorid p.A.
Fa. Merck, Art. 6404

Chemikalien für die Dünnschichtchromatographie siehe unter Punkt 5.2.2.

GC-Säule: 2,4m x 3mm i.D. silanisiertes Glas
10% Silar 10C, 80-100 mesh Gas-Chrom Q
Fa. W. Günther, Analysentechnik, Griesheim

Fettsäuren - Vergleichsubstanzen

Lipid-Standard 189-1
Fa. Sigma Best.Nr. 189-1

Lipid-Standard 189-4
Fa. Sigma Best.Nr. 189-4

Lipid-Standard 189-5
Fa. Sigma Best.Nr. 189-5

Pentadecansäure
Fa. Merck Art. 5673

zu Punkt 6.1.: Versuchstiere

Versuchstiere und Futter siehe Punkt 5.3.

Pitressin-Tannat siehe Punkt 5.3.1.

zu Punkt 6.2.: Versuchsdurchführung

Histidin
Fa. Merck, Art.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
Fa. Merck, Art. 943

Saccharose
Fa. Merck, Art.

zu Punkt 6.4.1. Durchführung des Testes

Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
Fa. Merck, Art. 8382

Magnesiumchlorid
Fa. Merck, Art. 5833

Kaliumcitrat
Fa. Sigma Best.Nr. C 8385

Mercaptoethanol
Fa. Sigma Best.Nr. M 6250

Malic-Dehydrogenase, 10 000 U
Fa. Sigma Best.Nr. M 2634

Küvetten: Einfache Glasküvetten mit 1,0 oder 3,0 ml
Fassungsvermögen und 1 cm Schichtdicke
Fa. Hellma, Müllheim

Photometer: Zeiss Spektralphotometer PM 2 D

Coenzym A
Fa. Sigma Best.Nr. C 3144

NADH
Fa. Boehringer Mannheim Best.Nr. 107727

ATP
Fa. Boehringer Mannheim Best.Nr. 519979

zu Punkt 6.5.1.: Durchführung des Testes

Triethanolamin-HCl
Fa. Sigma Best.Nr. T 1502

Magnesiumchlorid siehe Punkt 6.4.1.

Glucose-6-phosphat
Fa. Boehringer Mannheim Best.Nr. 127027

NADP
Fa. Boehringer Mannheim Best.Nr. 127353

Küvetten und Photometer siehe Punkt 6.4.1.

zu Punkt 6.6.1.: Durchführung des Testes

Magnesiumsulfat
Fa. Merck Art. 5886

DL- Äpfelsäure (Dinatriumsalz)
Fa. Merck Art. 820872

Triethanolamin und NADP siehe Punkt 6.5.1.

EDTA siehe Punkt 6.2.

Küvetten und Photometer siehe Punkt 6.4.1.

9. Abkürzungsverzeichnis

ΔE = Extinktionsänderung
Δt = Messintervall
ε = Extinktionskoeffizient
μCi = 10^{-6} Curie
μg = 10^{-6} Gramm
μl = 10^{-6} Liter
ADH = Antidiuretisches Hormon
ADP = Adenosindiphosphat
AMP = Adenosinmonophosphat
Asn = Asparagin
AP = Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
at = Atmosphäre
ATP = Adenosintriphosphat
^{o}C = Grad Celsius
CDP = Cytidindiphosphat
CoA = Coenzym A
Cys = Cystein
d = Schichtdicke
DC = Dünnschichtchromatographie
FID = Flammenionisationsdetektor
g = Gramm
Gln = Glutamin
Gly = Glykokoll
G6P-DH = Glucose-6-phoshat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
h = Stunde
I.D. = Innendurchmesser
l = Liter
Lys = Lysin
M = molar
mCi = 10^{-3}Curie
MDH = Malic Dehydrogenase
mg = 10^{-3} Gramm
ml = 10^{-3} Liter

min = Minute
mm = 10^{-3} Meter
mM = 10^{-3} molar
mmol = 10^{-3} Mol
mU = 10^{-3} Unit
n = Anzahl
NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH = reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH = reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
nm = 10^{-9} Meter
Phe = Phenylalanin
P_i = anorganisches Phosphat
Pro = Prolin
S.D. = Standardabweichung
Sdp = Siedepunkt
sec = Sekunde
Std = Stunde
Temp = Temperatur
TRA = Triethanolamin
Tris = Tris (hydroxylmethyl)-aminomethan
Tyr = Tyrosin
U = Unit
U/min = Umdrehung pro Minute
v = Volumen

10. Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E.	Arzneimittelwirkungen - Ein Lehrbuch Pharmakologie für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen 4. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart
2. Karlson, P.	Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 11. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart
3. Deenen, L.L.M. van	Phospholipide-Beziehungen zwischen ihrer chemischen Struktur und Biomembranen Naturwissenschaften 59, 485-491 (1972) Springer Verlag
4. Bucher,O.	Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Medizinischer Verlag Hans Huber Bern, Stuttgart, Wien (1970)
5. Kriz, W.	Der architektonische und funktionelle Aufbau der Rattenniere Zeitung für Zellforschung 82, 495-535 (1967)
6. Sperber, L.	Studies on the mammalian kidney Zool. Bidr. Uppsala 22, 249-431 (1944)
7. Chen, R.F.	Removal of fatty acids from serum albumin by charocoal treatmemt J. Biol. Chem. 242, 173-181 (1967)
8. Malathi, Preiser, Fairclough, Mallett and Cane	A rapid method for the isolation of kidney brush border membranes Biochim. Biophys. Acta 554, 259-263 (1979)
9. Folch, Less and Stanley	A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)
10. Coleman,R. and Finean H.	Preparation and properties of isolated plasma membranes from guinea-pig tissues Biochim. Biophys. Acta 125, 197-206 (1966)
11. Neville, D.M.	The isolation of a cell membrane fraktion from rat liver J. Biophy. Biochem. Cytol. 8, 413-422 (1960)

12. Emmelot,P., Bos,C.J., Benedetti,E.L. and Rümke,Ph.
Studies on plasma membranes 1) Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver
Biochim. Biophy. Acta 90, 126-145 (1964)

13. Manitius,A., Bensch, K. and Epstein, F.H.
(Na^+ - K^+)-activated ATPase in kidney cell membranes of normal and methylprednisolonetreated rats
Biochim. Biophy. Acta 150, 563-571 (1968)

14. Fitzpatrick,D.F., Davenport,G.R., Forte,L. and Landon, E.J.
High-performance liquid chromatographic separation and direct ultraviolet detection of phospholipids
J. Biol. Chem. 244, 3561-3569 (1969)

15. Kinne,R. and Kinne-Saffran E.
Isolierung und enzymatische Charakterisierung einer Bürstensaumfraktion der Rattenniere
Pflügers Arch. 308, 1-15

16. Thuneberg,L. and Rostgaard,J.
Isolation of brush border fragments from homogenates of rat and rabbit kidney cortex
Exp. Cell Res. 51, 123-140 (1968)

17. Berger,S.J. and Sacktor,B.J.
Isolation and biochemical charakterization of brush borders from rabbit kidney
J. Cell Biol. 47, 637-645 (1970)

18. Wilfong,R.G. and Neville,D.M.
The isolation of a brush border membrane fraction from rat kidney
J. Biol.Chem. 245, 6106-6112 (1970)

19. Schmitz,J.,Preuser, H.,Maeshacci,D., Gosh,B.K., Cerda, J.J. and Crane,R.K.
Purification of the human intestinal brush border membrane
Biochim. Biophy. Acta 323, 98-112 (1973)

20. Booth,A.G. and Kenny,A.J.
A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney
Biochem. J. 142, 575-581 (1974)

21. Evers,C.,Haase,W., Murer,H. and Kinne,R.
Properties of brush border vesicles isolated from rat kidney cortex by calcium precipitation
Membrane Biochem. 1, 203-220, (1978)

22. Beisenherz,G., Boltze, H.J., Bücher,Th., Czok,R.,Garbade,K.H., Meyer-Arendt,E. und Pfleiderer,G.
Diphosphofructose-Adenolase, Milchsäure-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. Naturforschung 8b, 555 (1953)

23. Skipsky,V.P. and Barcley,M.
Thin-layer chromatography of lipids
Methods Enzymol. 14, 530-598 (Lowenstein,J.M. ed.)
Academic Press, New York - London (1969)

24. Stüve,J.
Lipidstoffwechsel an der Bürstensaummembran unter Einfluß von Aldosteron
Dissertation, Berlin 1980

25. Bosch,H.van den, Bente,H.A. and Deenen, L.L.M. van
On the anabolism of lysolecithin
Biochim. Biophy. Acta 98, 648-651 (1965)

26. Scherphoff,G.L. and Deenen,L.L.M. van
On the pathways of fatty acid incorporation into the lipids of subcellular particles of rat liver and into erythocytes
Biochim. Biophy. Acta. 113, 417-420 (1966)

27. Gurr,M. and James, A.
Lipid biochemistry
Chapman and Hall, London

28. Valtin,H., Schroeder, H.A., Benirschke,K. and Sokol,H.W.
Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats
Nature 196, 1109-1110, London (1962)

29. Saul,G.B.H., Garrity, E.B., Benirschke,K. and Valtin, H.
Inherites hypothalamic diabetes insipidus in the brattleboro strain of rats
J. Hered. 59, 113-117 (1968)

30. Sokol,H.W. and Sise, J.
The effect of exogenous vasopressin and growth hormone on the growth of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus
Growth 37, 127-142 (1973)

31. Valtin,H., Sawyer, W.H. and Sokol,H.W.
Neurohypophyseal principles in rats homozygous and heterozygous for hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain)
Endrocrinol. 77, 701-706 (1965)

32. Harrington,A.R. and Valtin,H.
Impaired urinary concentration after vasopressin and its gradual correction in hypothalamic diabetes insipidus
J. Clin. Invest. 47, 502-510 (1968)

33. Möhring,B. and Möhring, J. — Plasma ADH in normal Long-Evans rats and in Long-Evans rats heterozygous and homozygous for hypothalamic diabetes insipidus
Life Sci. 17, 1307-1314 (1975)

34. Krieger,D.T. and Liotta,A. — Pituitary ACTH responsivenesss in the vasopressin deficient rat
Life Sci. 20, 327-336 (1977)

35. Bakker,H.R.,Dyball, R.E.I. and Jones,C.W. — Increased neutral lobe content of neurophysin S in rats treated with exogenous vasopressin
Nature 225, 734-735 (1975)

36. Kirsten,E., Kirsten, R., Leaf,A. and Sharp, G.W.G. — Increased activity of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in response to aldosterone in the tood bladder
Pflügers Arch. 300, 213 (1968)

37. Walker,P.R. and Bailey,E. — Role of "malic enzyme" in lipogenesis
Biochim. Biophys. Acta 187, 591-593 (1969)

38. Kornacker,M.S. and Ball,E.G. — Citrat clevage in adipose tissue
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 899-911 (1965)

39. Tswett,M.S. — Ber.dtsch.botan.Ges. 24, 316-384 (1906)

40. Lederer,E. and Lederer,M. — Chromatography 2nd ed. Amsterdam Elsevier (1957)

41. Heftmann,E. — Chromatography
New York: Reinhold (1969)

42. Hesse,G. — Chromatographisches Praktikum
Frankfurt: Akad.Verlagsges. (1968)

43. Giddings,J.C. — Dynamics of Chromatography
New York: Marcel Dekker (1965)

44. Engelhardt,H. — Hochdruchflüssigkeitschromatographie
Springer Verlag, Berlin (1977)

45. Jungalawala,F.B., Turel,R.J., Evans,J.E. and McCluer,R.H. — Sensitive analysis of ethanolamine- and serine-containing phospho-glycerides by high-performance liquid chromatography
Biochem. J. 145, 517-526 (1975)

46. Firoze,B., Jungalawala,F.B., Evans,J.E. and McCluer, R.H. — High-performance liquid chromatography od phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in the region of 200 nm
Biochem. J. 155, 55-60 (1976)

47. Kessel,W.S.M., Guerts, van H., Hax, W.M.A., Demel,R.A. and Gier, J. de
High-performance liquid chromatographic separation and direct ultraviolet detection of phospholipids
Biochim. Biophys. Acta 486, 542-530 (1977)

48. Hax,W.M.A., Kessel, W.S.M. and Guerts, van H.
High-performance liquid chromatographic separation and photometric detection of phospholipids
J. Chromatogr. 142, 735-741 (1977)

49. Kaitaranta,J.K. and Bessman,S.P.
Determination of phospholipids by a combined liquid chromatograph -Automated phosphorus analyzer-
Anal. Chem. 53, 1232 (1981)

50. Chen,S.S.-H., Kou, A.Y. and Chen,H.H.-Y
Measurement of ethanolamine- and serine-containing phospholipids by high-performance liquid chromatography with fluorescence determination of their Dns derivatives
J. Chromatogr. 208, 339-346 (1981)

51. Kiuchi,K., Ohta,T. and Ebine,M.
High-performance liquid chromatographic separation and quantitative analysis of synthetic phospholipids
J. Chromatogr. 133, 226-230 (1977)

52. Briand,R.L., Harold, S. and Blass,K.G.
High-performance liquid chromatographic determination of the lecithin/sphingomyelin ratio in amnioti fluid
J. Chromatogr. 223, 277-284 (1981)

53. Hanson,V.L., Park,J. Osborn,T.W. and Kiral R.M.
High-performance liquid chromatographic analyses of egg yolk phospholipids
J. Chromatogr. 205, 393-400 (1981)

54. Gross,R.W. and Sobel B.E.
Isocratic high-performance liquid chromatography separation of phosphoglycerides and lysophosphoglycerides
J. Chromatogr. 197, 79-85 (1980)

55. Chen,S.S.-H, and Kou,A.Y.
Improved proeducre for the separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography
J. Chromatgr. 227, 25-31 (1982)

56. Radke,M., Schäfer, H. und Kruse-Jarres, J.D.	Gaschromatographische Bestimmung von Lipiden Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 231-237 (1975)
57. Klöppel,U.	Enzymaktivität, Elektrolytgehalt und Marphologie in der Niere von Ratten mit angeborenem, neurogenen Diabetes insipidus (brattleboro-Stamm) Dissertation, Frankfurt 1982
58. Srere,P.A.	The citrat cleavage enzym J. Biol. Chem. 234, 2544 (1959)
59. Bergmeyer,H.U.	Methoden der enzymatischen Analyse 2. Aufl., Chemie, Weinheim/Bergstr (1970)
60. Mück,R.	Inkorporation von ^{14}C-Cholin in die Phospholipide von Herz, Muskel und Lunge und ihre Beeinflussung durch Vorbehandlung mit Phenobarbital und durch Urethannarkose Dissertation, Berlin 1975
61. Dousa,T.P. and Valtin H.	Cellular actions of vasopressin in the mammalian kidney Kidney International 10, 46-63 (1976)
62. Handler,Js. and Orloff,J.	The mechanism of action of anti-diuretic hormon In: Handbook of physiology Section 8. Renal physiology Washington D.C., Am.Physiol.Soc. (1973)
63. Dousa,T.P.	Role of cyclic-AMP in action of antidiuretic hormone on kidney Life Sci. 13, 1033-1040 (1973)
64. Dousa,T.P.	Cellular action of antidiuretic hormone in nephrohenic diabetes insipidus Mayo Clin. Proc. 49, 188-199 (1974)
65. Löffler,G., Harper, H.A., Petrides,P.E. und Weiss L.	Physiologische Chemie Springer Verlag Berlin,Heidelberg New York (1975)
66. Wirthenson,G., Gerl, M. and Guder,W.G.	Triacylglycerol metabolism in kidney cortex and other medulla Int.J.Biochem 12, 157-161 (1980)
67. Wirthenson,G. and Guder,W.G.	Triacylglycerol metabolism in isolated rat kidney cortex tubules Biochem. J. 186, 317-324 (1980)

68. Valtin,H. — Funktion der Niere
Mechanismen zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts im gesunden Organismus
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart New York 1978

69. Kirsten,E.,Seger,W., Nelson,K. and Kirsten, R. — Study on the properties of mitochondria from rat kidney cortex and red medulla
In: Schmidt,U. and Dubach,U.C. Renal metabolism in relation to renal funktions
1.Aufl. Hans Huber Bern, Stuttgart, Vienna, 134-141 (1976)

70. Weinstein,S.W. and Szjewicz,J. — Individual nephron funktion and renal oxygen consumption in the rat
Amer.J.Physiol. 227, 171-172 (1974)

71. Dawson,R.M.C. — The metabolism of animal phospholipids and their turnover in cell membranes
In: Essays in Biochemistry 2, 69-115 (1966)
The Biochemical Society by Academic Press

72. Bader,H. — Morphologische und chemische Grundlagen der Zellmembran
In: Gauer,O.H.; Kramer,K. und Jung, R.
Hrsg: Physiologie des Menschen
Bd. 1, München,Berlin,Wien
Urban und Schwarenber 1972

73. Dawson,H. — A textbook of general physiology
London: Churchill 1970

74. Stein, W.D. — The movement of molecules across the cell membranes
New York, Academic Press 1967

75. Thews,G. — Diffusion und Permeation
In: D-Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie
Hrsg: Barthelheimer,H., Hey,W.de und Thorn,W.
Stuttgart 1966

76. Harth,O. — Nierenfunktionen
In:Physiologie des Menschen
Schmidt,R.F. und Thews,G.
20.Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

77. Ullrich,K.J. — Glycerylphosphorylcholinumsatz und Glycerylphosphorylcholin-diesterase in der Säugetierniere Biochem.Z. 331, 98-102 (1959)

78. Bücher,Th., Luh,W. und Pette,D. — Malic Enzym In: Hoppe,Seyler,Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathalogisch-chemischen Analyse Bd.VI/A, 10.Aufl. Springer Verlag Berlin,Göttingen,Heidelberg 292-339 (1964)

79. Lehninger,A.L. — Biochemistry 2.Aufl., Worth Publishers Inc New York 1975

Danksagungen

Frau K. Nelson gilt besonders herzlicher Dank für die überaus wertvolle Hilfe bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit.

Zu besonderem Dank bin ich der Hermann-Schlosser-Stiftung verpflichtet, aus deren Mitteln mir ein Stipendium gewährt wurde.

Sehr herzlich danke ich weiterhin Herrn Prof. Dr. N. Rietbrock und Herrn Prof. Dr. A.H. Staib für das Arbeiten an den GC- und HPLC-Geräten,
Herrn Dr. G. Oremek für die Unterstützung beim Korrekturlesen und die konstruktive Kritik,
der Fa. Parke-Dawis für die Überlassung des Pitressin-Tannat.

Ganz herzlich möchte ich auch an dieser Stelle meinem ehemaligen Lehrer, Herrn K. Wodarz danken, der in mir das Interesse am naturwissenschaftlichen Arbeiten weckte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

LIPIDSTOFFWECHSEL AN DER BÜRSTENSAUMMEMBRAN DER RATTENNIERE UNTER EINFLUSS VON ANTIDIURETISCHEN HORMON (ADH)

im Zentrum der Pharmakologie des Fachbereich Humanmedizin unter Leitung von:

Prof.Dr.R: Kirsten und

Prof.Dr.Dr.H. Fasold

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen naturwissenschaftlichen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 21.11.1983

Judith Neff

Lebenslauf

21.08.1956	Geboren in Heldenbergen, Kreis Friedberg, als Tochter der Eheleute Alexander Neff und seiner Frau Rosel geb. Stowasser
1.4.1963 bis 30.11.1966	Besuch der Volksschule in Heldenbergen
1.12.1966 bis Juni 1972	Besuch der Adolf-Reichwein-Realschule in Friedberg mit dem Abschluß der Mittleren Reife
4.8.1972 bis 9.5.1975	Besuch des Augustinergymnasium in Friedberg, abgeschlossen mit dem Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
1.10.1975 bis 14.5.1980	Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, abgeschlossen mit dem Staatsexamen Teil A für Lebensmittelchemiker
1.6.1980 bis 31.5.1981	Pflichtpraktikum am Chemischen Unter-untersuchungamt in Mainz, abgeschlossen mit dem Staatsexamen Teil B für Lebens-mittelchemiker
Ab Juli 1981	Beginn der Doktorarbeit am Institut für klinische Pharmakologie im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von Herrn Prof.Dr. R. Kirsten

Judith Neff

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353